

Expression von Tropoelastin und Lysinoxidase **in Pflanzen**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von **Urte Kristina Wendt**
aus Berlin

1. Referent: PD Dr. Klaus Düring

2. Referent: PD Dr. Reinhard Hehl

eingereicht am: 01.11.2001

mündliche Prüfung (Disputation) am: 25.01.2002

Druckjahr: 2002

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	„Molecular Farming“	5
1.2	Elastin	8
1.3	Anwendungsbereiche von Elastin und dessen Komponenten	11
1.4	Synthetische Gene	13
2	Material	16
2.1	Chemikalien und Enzyme	16
2.2	Bakterienstämme und Plasmide	17
2.3	Hefestämme und Plasmide	18
2.4	Oligonukleotide	19
2.5	Pflanzen	20
2.6	Computergestützte Analysen	20
3	Methoden	21
3.1	Molekularbiologische Standardmethoden	21
3.2	Herstellung synthetischer Gene	21
3.2.1	Design der synthetischen Sequenz	21
3.2.2	Strategie der Assemblierung von synthetischen Genen	22
3.2.3	Synthese des Plus-Strangs	23
3.3	in vitro Mutagenese	24
3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
3.5	Sequenzanalyse	25
3.6	Proteinbestimmung	25
3.7	SDS-PAGE	25
3.8	Western-Blot Analyse	25
3.8.1	Immunologischer Nachweis	26
3.8.2	Nachweis mit Strep-Tactin-AP-Konjugat	27
3.9	Sandwich-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	27
3.10	Immunpräzipitation	28
3.11	Reinigung von Tropoelastin	28
3.12	LOX-Aktivitätstest	28
3.13	Klonierungsstrategien	29
3.13.1	Bakterielle Strep-Tag II-Expressionsvektoren	29
3.13.1.1	sTEL-Konstrukte	29
3.13.1.2	sLOX-Konstrukte	29
3.13.2	Klonierung der Plasmide zur Expression von TEL und LOX in Kartoffelpflanzen	29
3.13.2.1	Expression von LOX im Apoplasten	30
3.13.2.2	Expression von LOX in Plastiden	30
3.13.2.3	Expression von TEL im Apoplasten	30
3.13.2.4	Expression von TEL in Plastiden	31

3.13.3	Herstellung der Pichia pastoris Expressionsvektoren	31
3.13.3.1	Expression von LOX im Cytosol.....	31
3.13.3.2	Sekretion von LOX ins Medium.....	31
3.13.3.3	Expression von TEL im Cytosol	31
3.13.3.4	Sekretion von TEL ins Medium	31
3.13.4	GFP-Fusionsproteine.....	32
3.13.4.1	Vorkonstrukt mit AGPase-Signalpeptid	32
3.13.4.2	Plastidär lokalisierte TEL:GFP-Fusion	32
3.13.4.3	Plastidär lokalisierte LOX:GFP-Fusion.....	32
3.13.4.4	Plastidär lokalisierte GFP:LOX-Fusion.....	32
3.13.4.5	Plastidär lokalisierte Propeptid:hLOX:GFP-Fusion	33
3.14	Kulturen von E. coli-Zellen	33
3.15	Strep-Tag Expressionssystem	33
3.15.1	Expression von rekombinanten Proteinen in E. coli	33
3.15.2	Aufschluß von E. coli-Zellen	33
3.16	Kultur und Transformation von Agrobacterium tumefaciens.....	34
3.17	Pichia pastoris Expressionssystem.....	34
3.17.1	Herstellung und Transformation kompetenter Hefezellen	35
3.17.2	Expression im mut ⁺ -Stamm X-33.....	35
3.17.3	Expression im mut ^S -Stamm KM71H	35
3.17.4	Aufschluß von Hefezellen	36
3.17.5	Analyse des Mediums nach extrazellulärer Expression in Hefezellen	36
3.18	Isolierung von Gesamt-RNA aus Blattmaterial	36
3.19	Northern-Blot Analyse	36
3.19.1	Herstellung von antisense RNA-Sonden	37
3.19.1.1	sTEL-Sonde.....	37
3.19.1.2	sLOX-Sonde	37
3.19.2	Elektrophorese und Detektion	37
3.20	Transformation von Kartoffelblättern und pflanzliche Gewebekultur	37
3.21	Analyse transgener Pflanzen	38
3.21.1	Aufschluß von Blattgewebe	38
3.21.2	Aufschluß von Knollengewebe	38
3.21.3	Isolierung von Plastiden.....	39
3.22	Transiente Transformation von Protoplasten.....	39
3.22.1	Protoplasten aus Tabakblättern.....	39
3.22.1.1	Präparation von Protoplasten.....	39
3.22.1.2	PEG-Transformation der isolierten Protoplasten	40
3.22.2	Protoplasten aus Tabak-Suspensionskulturen	40
3.22.2.1	Isolierung von Protoplasten aus BY2-Suspensionskultur	40
3.22.2.2	PEG-Transformation der Protoplasten aus BY2-Suspensionkultur	41
3.22.2.3	Aufschluß von Protoplasten	41

3.22.2.4	Analyse des Mediums zum Nachweis von sekretierten Proteinen	42
3.22.3	Fluoreszenz-Mikroskopie	42
4	Ergebnisse.....	43
4.1	Lysinoxidase (LOX).....	43
4.1.1	Herstellung des synthetischen LOX-Gens (sLOX) mit angepaßter „Codon Usage“	43
4.1.1.1	Design der synthetischen Sequenz.....	43
4.1.1.2	Synthese der angepaßten sLOX-Sequenz	44
4.1.2	Etablierung eines Systems zur Herstellung von LOX als Positivkontrolle	45
4.1.2.1	Expression von LOX in Hefe	46
4.1.2.1.1	Sekretion von LOX ins Medium	46
4.1.2.1.2	Intrazelluläre Expression von LOX.....	46
4.1.2.2	Expression von LOX in E. coli	47
4.1.3	LOX Aktivitätstest.....	50
4.1.4	Stabile Transformation von Kartoffelpflanzen mit sLOX	52
4.1.5	Analyse der transgenen LOX-Pflanzen.....	52
4.1.5.1	Northern-Blot Analyse	52
4.1.5.2	Western-Blot Analyse der LOX-Linien.....	53
4.1.5.2.1	Testen des LOX-Antiserums	53
4.1.5.2.2	Nachweis von LOX in transgenen Pflanzen.....	54
4.1.5.2.3	Analyse von transgenem Knollenmaterial.....	55
4.1.6	Transiente Tests in Tabak-Protoplasten	55
4.1.6.1	Herstellung der Konstrukte	55
4.1.6.2	Optimierung der Versuchsbedingungen mit den Kontrollplasmiden	56
4.1.6.3	Fluoreszenzuntersuchungen nach transienter Expression von LOX-GFP Fusionsproteinen.....	58
4.1.6.4	Western-Blot Analyse und Detektion im Sandwich-ELISA	59
4.2	Tropoelastin (TEL)	60
4.2.1	Herstellung des synthetischen TEL-Gens (sTEL) mit angepaßter „Codon Usage“	60
4.2.1.1	Design der synthetischen Sequenz.....	60
4.2.1.2	Synthese der angepaßten sTEL-Sequenz	62
4.2.2	Etablierung eines Systems zur Herstellung von TEL als Positivkontrolle.....	64
4.2.2.1	Expression von TEL in Hefe	64
4.2.2.1.1	Sekretion von TEL ins Medium	65
4.2.2.1.2	Intrazelluläre Expression von TEL	65
4.2.2.2	Expression von TEL in E. coli.....	65
4.2.2.2.1	Expression von rekombinantem TEL mit N-terminalem Strep-Tag II in XL1-Blue	66
4.2.2.2.2	Optimierung des Zellaufschlusses	67
4.2.2.2.3	Degradation.....	68
4.2.2.2.4	Expression von TEL im Protease-defizienten E. coli-Stamm BL21	68
4.2.2.2.5	Anreicherung von TEL durch Affinitätschromatographie	69

4.2.2.2.6	Untersuchung der Stabilität von angereinigten TEL-Präparationen	71
4.2.3	Stabile Transformation von Kartoffelpflanzen	73
4.2.3.1	Konstruktion der TEL-Expressionskassetten	73
4.2.4	Analyse der transgenen TEL-Pflanzen	74
4.2.4.1	Northern-Blot Analyse	74
4.2.5	Western-Blot Analyse.....	75
4.2.5.1	Testen des TEL-Antiserums.....	75
4.2.5.2	Nachweis von TEL in Blattextrakten.....	76
4.2.5.3	Isolierung von Plastiden	77
4.2.5.4	Analyse von Knollenmaterial	77
4.2.6	Transiente Tests mit GFP-Fusionsproteinen	78
4.2.6.1	Herstellung der Konstrukte.....	78
4.2.6.2	Fluoreszenzuntersuchungen nach transienter Expression von TEL-GFP Fusionsproteinen.....	78
4.2.6.3	Western-Blot Analyse	78
4.2.6.4	Sandwich-ELISA.....	79
5	Diskussion.....	81
5.1	Expression von TEL und LOX in Pflanzen.....	81
5.2	Überexpression der synthetischen Gene in <i>Pichia pastoris</i> und <i>Escherichia coli</i>	90
5.2.1	<i>Pichia pastoris</i>	90
5.2.2	<i>Escherichia coli</i>	92
5.3	Ausblick.....	97
6	Zusammenfassung	99
7	Anhang.....	100
7.1	Abkürzungen	100
7.2	Abbildungsverzeichnis	101
8	Literatur.....	102

1 EINLEITUNG

1.1 „Molecular Farming“

Mit der Entwicklung der Gentechnik und der damit verbundenen Möglichkeit transgene Pflanzen herzustellen, haben sich in den letzten Jahren neue Perspektiven im Bereich der Pflanzenbiotechnologie eröffnet. Traditionell wurden Pflanzen vorwiegend zur Nahrungsmittelproduktion, zur Extraktion pharmazeutisch relevanter Stoffe und zur Gewinnung von technisch interessanten Substanzen (z.B. Stärke, Duftstoffe, Kautschuk, Öle) verwendet. Durch die Möglichkeit, gezielte genetische Veränderungen an Pflanzen vorzunehmen, hat der pflanzliche Organismus sowohl für die Grundlagenforschung als auch für wirtschaftliche Forschungszwecke neue Bedeutung bekommen.

Von besonderem Interesse ist in den letzten Jahren das sogenannte „Molecular Farming“, bei dem Pflanzen als Expressionssystem zur Herstellung von Fremdproteinen genutzt werden. Bislang werden zur Expression rekombinanter Proteine hauptsächlich Zellkulturen (Bakterien-, Hefe-, Säuger- und Insektenzellen) oder transgene Säugetiere eingesetzt, wobei sich die industrielle Entwicklung vorwiegend auf die Proteinproduktion durch Zellkulturen in Fermentern konzentriert. Pflanzliche Expressionssysteme haben gegenüber den anderen aufgeführten Systemen eindeutige Vorteile, die nachfolgend näher erläutert werden sollen.

Zellkulturen müssen unter sterilen und extrem standardisierten Bedingungen angezogen werden und sind daher technisch schwer zu handhaben. Die Zusammensetzung des Mediums, die Luftzufuhr, die Temperatur und die Umwälzgeschwindigkeit der Kultur sind nur einige Parameter, die bei der Anzucht genau eingehalten und determiniert werden müssen, um eine optimale Proteinausbeute zu erzielen. Aus diesem Grund sind diese Systeme anfällig, teuer, und es müssen Fermenter und Inkubatoren mit dem entsprechenden Volumen vorhanden sein, damit rekombinante Proteine in den erforderlichen Mengen hergestellt werden können. Ein weiteres Problem der Zellkultur-basierten Proteinproduktion ist die Vergrößerung des Produktionsmaßstabs. Aufgrund der veränderten Bedingungen müssen die Anzuchtparameter unter großem Zeitaufwand neu optimiert werden. Außerdem hat sich durch einen stark steigenden Bedarf eine kritische Verknappung der Produktionskapazität entwickelt.

Im Gegensatz hierzu können Pflanzen einfach und ohne großen technischen Aufwand angezogen werden. Transgene Pflanzen benötigen zum Wachstum nur Wasser, Sonne und nährstoffreichen Boden und können von Landwirten oder Züchtern in der bestehenden Infrastruktur angebaut und geerntet werden. Lediglich die Transformation und Regeneration der Pflanzen muß unter sterilen Bedingungen erfolgen. Im Anschluß daran können die

Pflanzen im Gewächshaus oder auf dem Feld angezogen und nach Bedarf vermehrt werden. Die Vergrößerung des Produktionsmaßstabs ist mit transgenen Pflanzen im Gegensatz zu Zellkulturen ohne weiteres möglich. Innerhalb weniger Monate können durch vegetative Vermehrung aus einer Kartoffelpflanze viele identische Pflanzen generiert werden. Für den Feldanbau muß lediglich die Anbaufläche vergrößert werden, eine Veränderung der Anbau- und Erntebedingungen ist nicht erforderlich.

Inzwischen ist es möglich, diverse monokotyle (u.a. Mais, Gerste, Reis) und dikotyle Pflanzenspezies (u.a. Arabidopsis, Kartoffel, Tabak) stabil zu transformieren. Je nach Anwendung und den herrschenden klimatischen Verhältnissen kann eine geeignete Art ausgewählt und zur stabilen Transformation mit dem gewünschten Transgen verwendet werden. Weiterhin besitzen einige Pflanzenarten lagerfähige Speicherorgane wie zum Beispiel Knollen, die als Expressionsort für Fremdproteine genutzt werden können. Dies hat den Vorteil, daß in solchen Geweben produzierte Proteine nach der Ernte oft über Monate eingelagert werden können und nicht sofort weiterverarbeitet werden müssen. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß der Fremdproteingehalt während der Lagerung abnimmt. Artsaenko *et al.* (1998) haben zum Beispiel gezeigt, daß nach Expression eines Einzelketten-Antikörpers in Kartoffelknollen 2 Monate nach der Ernte noch 63% und 4 Monate später nur noch 53% des ursprünglichen Fremdproteingehalts nachzuweisen waren.

Ein weiterer Vorteil des pflanzlichen Systems ist das Fehlen humanpathogener Kontaminationen. Nach Expression von Proteinen in Bakterienkulturen kann das Produkt mit Endotoxinen kontaminiert sein, die durch kostenintensive Methoden aus der Proteinfraction entfernt werden müssen (Petsch & Anspach, 2000). Die Herstellung von Fremdproteinen in tierischen Systemen (Zellkultur, transgene Säugetiere) ist mit anderen Problemen behaftet. Potentiell können so hergestellte Proteinpräparationen mit Krankheitserregern kontaminiert sein, die bei Verzehr oder medizinischer Anwendung der Produkte auf den Menschen übertragen werden können (z.B. HIV, Prione, onkogene Retroviren). Aus diesen Gründen sind Pflanzen gerade für die Produktion von Proteinen, die in Lebensmittel- und Pharmaindustrie Verwendung finden, von großer Bedeutung.

Ein anderer Vorteil pflanzlicher Expressionssysteme besteht darin, daß sie als Eukaryoten in der Lage sind, rekombinant exprimierte Proteine posttranslational zu modifizieren. Die N-Glykosylierung ist zum Beispiel für die biologische Aktivität vieler eukaryotischer Proteine essentiell. Dieser Modifikationstyp ist in höheren Organismen prinzipiell konserviert, unterscheidet sich aber bei Tieren und Pflanzen im Detail. Pflanzenspezifische komplexe N-Glykane weisen typische Strukturen auf, die von denen in Säugerzellen hauptsächlich durch die Abwesenheit von Sialinsäuren und dem Vorkommen von $\beta(1,2)$ -Xylose- und $\alpha(1,3)$ -Fucose-Resten abweichen. Diese spezifischen Kohlenhydratstrukturen sind in den

N-Glykanen von vielen pflanzlichen Allergenen enthalten und wahrscheinlich an der IgE-Erkennung beteiligt (Garcia-Casado *et al.*, 1996; van Ree *et al.*, 2000). Nach intravenöser Gabe von komplex glykosylierten Pflanzenproteinen in Kaninchen zur Herstellung von Antisera werden hauptsächlich IgE gegen die pflanzentypischen Zuckerepitope gebildet. Daraus wurde abgeleitet, daß auch bei Menschen die Injektion von pflanzlichen Glykoproteinen zu unkontrollierten allergischen Reaktionen führen könnte. Im Gegensatz dazu haben Chargelegue *et al.* (2000) die Immunreaktion von Mäusen auf einen in Pflanzen produzierten Antikörper untersucht. Nach Applikation dieses Antikörpers wurden von den Tieren keine Antikörper gegen die pflanzenspezifischen Glykane gebildet. Inwieweit die Verwendung von glykosylierten pflanzlichen Proteinen als Therapeutika eine potentielle Gefährdung für den Menschen darstellt, wird bis heute kontrovers diskutiert. Daher versuchen in den letzten Jahren verschiedene Arbeitsgruppen, die Bildung pflanzenspezifischer Glykosylierungsmuster von vornherein zu unterbinden.

Ein Vorteil des pflanzlichen Systems ist, daß Ort und Zeitpunkt der Fremdgenexpression durch Wahl eines geeigneten Promotors zielgerichtet gesteuert werden kann, so daß rekombinante Proteine nicht während der gesamten Wachstumsphase bzw. nicht in allen Organen akkumulieren. Bei der Transformation von Raps werden zum Beispiel vielfach samenspezifische Promotoren eingesetzt, die ausschließlich in einem definierten Entwicklungsstadium im Samen aktiv sind (Sjödahl *et al.*, 1995; Ellerström *et al.*, 1996). Weiterhin gibt es Beispiele für induzierbare Promotoren, die z.B. erst nach der Ernte zur Expression des Fremdproteins führen (GapC4; Bülow *et al.*, 1999). Am häufigsten werden jedoch konstitutive Promotoren eingesetzt, die in der gesamten Pflanze und während aller Entwicklungsstufen aktiv sind. Besonders oft wird dabei der 35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus (Odell *et al.*, 1985) genutzt. Osteryoung *et al.* (1990) konnten mit diesem Promotor zum Beispiel eine Polygalakturonase aus Tomatenpflanzen in Tabak, Artsaenko *et al.* (1998) einen Einzelketten-Antikörper in Kartoffelpflanzen exprimieren.

Durch die Wahl eines geeigneten Signalpeptids ist es außerdem möglich, verschiedene subzelluläre Kompartimente in der Pflanzenzelle anzusteuern und experimentell den optimalen Expressionsort zu bestimmen. Es hat sich gezeigt, daß häufig ein bestimmtes Kompartiment für ein spezifisches Protein besonders geeignet ist. So konnten Einzelketten-Antikörper besser im ER als im Cytosol oder Apoplasten exprimiert werden, wohingegen IgG Moleküle die beste Expression nach Sekretion in den Apoplasten zeigten (Conrad & Fiedler, 1998). Mittlerweile sind eine Vielzahl von Signalpeptiden identifiziert worden, die den Import von Proteinen in das sekretorische System (Gomord *et al.*, 1999), die Vakuole (Neuhaus, 1996) und die Plastiden (Klösgen *et al.*, 1989) von Pflanzenzellen vermitteln.

Bisher sind sowohl pharmazeutisch als auch technisch interessante Proteine in verschiedenen Pflanzenarten, meist Tabak und Kartoffel, hergestellt worden (Übersichten in Goddijn & Pen, 1995; Whitelam, 1995; Daniell *et al.*, 2001). Dazu zählen zum einen Proteine, die als Impfstoffe eingesetzt werden können (Mason *et al.*, 1992), wie z.B. Oberflächenproteine von Viren, und zum anderen humane Proteine wie Kollagen (Ruggiero *et al.*, 2000), HSA (human serum albumin; Sijmons *et al.*, 1990) und α -Lactalbumin (Takase & Hagiwara, 1998). Besonders häufig wird jedoch an der Expression von monoklonalen Antikörpern und Antikörper-Fragmenten gearbeitet (Übersicht in Conrad & Fiedler, 1998). Bereits 1988 konnte gezeigt werden, daß sich die schweren und leichten Ketten eines Immunglobulins in Tabak korrekt assemblieren lassen und das resultierende Multimer biologisch aktiv ist (Düring, 1988).

Durch die beschriebenen Vorteile des „Molecular Farming“ eignet sich das pflanzliche Expressionssystem zur Herstellung von Proteinen, die für technische und pharmazeutische Anwendungsbereiche im großen Maßstab hergestellt werden sollen.

In dieser Arbeit sollten die humanen Proteine Lysinoxidase und Tropoelastin in Kartoffelpflanzen exprimiert werden, um *in vitro* das Polymer Elastin herstellen zu können. Bis heute ist es nicht gelungen, diese Proteine in großen Mengen rekombinant zu produzieren und für die Grundlagenforschung oder Industrie zur Verfügung zu stellen.

1.2 Elastin

Tropoelastin (TEL) und Lysinoxidase (LOX) sind Proteine, die zur Bildung von Elastin benötigt werden. Elastin ist Bestandteil elastischer Fasern und in der extrazellulären Matrix von Bindegeweben lokalisiert. Elastische Fasern sind im Bindegewebe aller Vertebraten mit Ausnahme der primitiveren Cyclostomata zu finden (Sage & Gray, 1979). Sie verleihen allen dehnbaren Geweben wie z.B. Knorpeln, Blutgefäßen und Haut die Elastizität, die für wiederholte, reversible Deformationen notwendig ist. Ultrastrukturell bestehen die elastischen Fasern aus zwei Komponenten. Die fibrilläre Komponente wird von den Mikrofibrillen gebildet. Die zweite Komponente der elastischen Fasern ist amorph und besteht ausschließlich aus Elastin. Mikrofibrillen bestehen aus fünf verschiedenen Proteinen (Gibson *et al.*, 1989) zu denen zwei Isoformen des Fibrillins (Sakai *et al.*, 1986; Zhang *et al.*, 1994) und die Mikrofibrillen-assoziierten Glykoproteine MAGP-1 (Gibson *et al.*, 1991) und MAGP-2 (Gibson *et al.*, 1996) gehören.

An die elastischen Fasern sind außerdem noch weitere Proteine assoziiert. Hier wurden unter anderen Lysinoxidase (Kagan *et al.*, 1986), EBP (elastin binding protein) und EBR (elastin binding receptor) (Mecham, 1991), Emilin (Bressan *et al.*, 1993), Osteopontin

(Pasquali-Ronchetti & Baccarani-Contri, 1997), Fibulin-1 (Roark *et al.*, 1995) und Proteoglykane (Baccarani-Contri *et al.*, 1990) identifiziert.

Elastin ist ein extrem unlösliches Polymer aus kreuzvernetzten Tropoelastin-Molekülen. Tropoelastin wird durch das Gen *eln* kodiert, das als Einzelkopie auf Chromosom 7 des humanen Genoms lokalisiert ist (Fazio *et al.*, 1991). Das Gen besteht aus 34 Exons, die durch sehr lange Introns getrennt werden (Bashir *et al.*, 1989). Bisher sind 11 verschiedene Isoformen des Tropoelastins identifiziert worden, die durch differentielles Spleißen der mRNA generiert werden. Es ist bis heute nicht vollständig geklärt, unter welchen Bedingungen die einzelnen Isoformen exprimiert werden (Indik *et al.*, 1987). Es gibt jedoch durch Untersuchungen an Ratten (Heim *et al.*, 1991) und Rindern (Parks *et al.*, 1988) Hinweise darauf, daß das alternative Spleißen vom Entwicklungsstadium der Zellen und vom Alter des Individuums beeinflusst wird.

Tropoelastin ist ein sehr hydrophobes Protein, das eine charakteristische Struktur aufweist. Auffällig ist zunächst die typische Aminosäurezusammensetzung. Über 70% der Sequenz besteht aus den Aminosäuren Glycin, Alanin, Prolin und Valin. Mit Ausnahme der Termini und Exon 26A ist das Protein aus alternierenden hydrophoben und hydrophilen Domänen zusammengesetzt (Abb.1). Die hydrophoben Bereiche dienen der Assoziation einzelner TEL-Moleküle, während die hydrophilen Domänen zwei bis drei Lysinreste enthalten, die für die Quervernetzung benötigt werden.

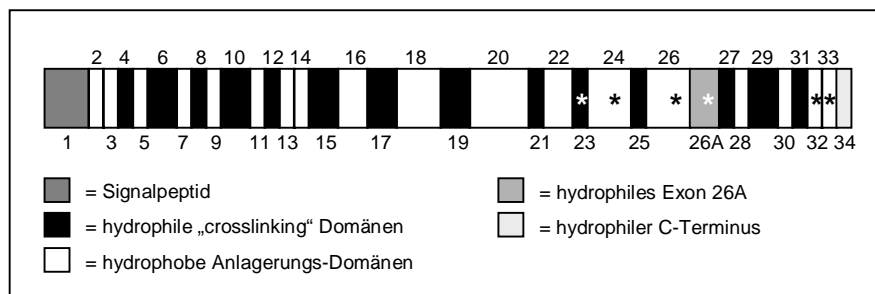


Abb. 1: cDNA-Struktur von humanem Tropoelastin. In der Graphik sind die Exons numeriert und die Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenzen durch einen Farbcode dargestellt. Mit einem Stern (*) markierte Exons unterliegen differentiellen Spleißvorgängen und sind in einigen Isoformen nicht vorhanden. Die Graphik ist nach Vrhovski & Weiss (1998) verändert und ergänzt worden.

Die Synthese von Elastin ist ein komplexer Vorgang und eng mit der Biogenese der elastischen Fasern verknüpft. Elastin ist in Vertebraten ausschließlich im Verbund mit elastischen Fasern zu finden. Erste *in vitro* Versuche mit löslichem Tropoelastin haben gezeigt, daß das Protein unter bestimmten thermodynamischen Bedingungen selbständig aggregiert. Dieser Prozeß der Coacervation beginnt bei Temperaturen über 20°C und ist bei anschließender Erniedrigung der Temperatur vollständig reversibel (Vrhovski *et al.*, 1997).

Die Analyse der elastischen Fasern hat jedoch gezeigt, daß die Anlagerung der Tropoelastin-Moleküle durch die Mikrofibrillen streng kontrolliert wird und die Orientierung der Moleküle und die Orte der Aggregation keinesfalls zufällig sind.

Brown-Augsburger *et al.* (1996) haben gezeigt, daß MAGP-1 mit dem C-Terminus von TEL interagiert und daß diese Bindung der Moleküle für die korrekte Elastogenese erforderlich ist. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, daß die Mikrofibrillen eine entscheidende Rolle bei der Elastin-Einlagerung spielen und als Grundgerüst für die korrekte Anlagerung dienen. Von der Arbeitsgruppe Debelle & Tamburro (1999) ist ein Modell entwickelt worden, wonach Tropoelastin erst nach Fertigstellung der Mikrofibrillen exprimiert wird. Während der Proteinbiosynthese wird TEL zunächst in das ER inseriert und hier an das Protein EBP („elastin binding protein“) gebunden, das als Chaperon während des Transports fungiert. Durch die Bindung von EBP wird vermutlich die Degradation von TEL während der Sekretion durch Maskierung der Protease-Angriffsstellen verhindert. Es wurde gezeigt, daß nicht-funktionelles EBP die Bildung von elastischen Fasern stört (Hinek *et al.*, 1991). Weiterhin verhindert EBP wahrscheinlich die intrazelluläre Aggregation der Moleküle über seine hydrophoben Bereiche und ermöglicht so die Sekretion in den Extrazellularraum (Hinek & Rabinovitch, 1994). Im Extrazellularraum wird die Affinität der Bindung durch einen an EBP bindenden Galaktose, der Bestandteil der Mikrofibrillen ist, erniedrigt und das freie TEL sofort in die wachsende elastische Faser eingebaut (Debelle & Tamburro, 1999; Hinek & Rabinovitch, 1994). Das Chaperon wird währenddessen recycelt (Hinek, 1997). Aus Organismen mit funktioneller LOX kann freies TEL nicht isoliert werden, was darauf hindeutet, daß freie TEL-Moleküle schnell und effizient zu Elastin verknüpft und nicht-funktionelle Moleküle rasch degradiert werden. Da elastische Fasern ein Leben lang halten und nicht erneuert werden, kontrolliert dieser Mechanismus die Bildung korrekter elastischer Fasern, so daß nur strukturell intakte Moleküle in die Fasern eingebaut werden können.

Nach Anlagerung des Tropoelastins werden einzelne Lysinreste im Protein durch die Lysinoxidase desaminiert (Brown-Augsburger *et al.*, 1995). Lysinoxidase (EC 1.4.3.13) gehört zu den kupferabhängigen Aminoxydasen und katalysiert die oxidative Desaminierung von Lysin zu Allysin. Das Enzym ist sowohl für die Quervernetzung des Kollagens als auch des Elastins verantwortlich. Das Allysin reagiert in folgenden Reaktionen spontan mit nahegelegenen Lysinen oder Allysinen, wodurch 2 Kollagenfasern oder 2-4 TEL-Moleküle untereinander verknüpft werden (Reiser *et al.*, 1992).

Lysinoxidase wird als Vorläuferprotein exprimiert und hat im reifen Zustand ein Molekulargewicht von 31 kDa. Da sowohl die Elastin- als auch die Kollagensynthese im Extrazellularraum stattfinden, wird dieses Enzym ebenfalls sekretiert. Nach Abspaltung des Signalpeptids im ER wird das Proenzym im Bereich des Propeptids glykosyliert. Vermutlich wird dadurch das Enzym im inaktiven und Transport-kompetenten Zustand gehalten. Nach

dem Transport in den Extrazellularraum wird das Propeptid durch die Protease BMP-1 (bone morphogenetic protein) abgespalten, wodurch LOX in die aktive Konformation überführt wird (Smith-Mungo & Kagan, 1998; Uzel *et al.*, 2001).

Es gibt diverse Krankheiten, die auf Defekte in der Elastin-Biosynthese zurückzuführen sind. Das Williams-Beuren Syndrom wird durch Deletionen im Tropoelastin-Allel verursacht. Betroffene Personen haben häufig Herz- und Gefäßmißbildungen, meist in Form einer supralvalvulären Aortenstenose (SVAS) (Curran *et al.*, 1993), also einer Enge der Hauptschlagader unmittelbar am Anschluß an das Herz. Außerdem sind geistige Retardation, frühzeitiges Altern der Haut, Magen- und Darmprobleme und Geräuschüberempfindlichkeit beschrieben worden.

Durch einzelne Mutationen im Tropoelastin-Gen werden zudem häufig SVAS ausgelöst, die durch verringerten Elastingehalt verursacht werden (Smoot, 1995).

Eine andere vererbte Krankheit ist Cutis laxa. Diese Krankheit wird X-chromosomal vererbt und führt zur Erschlaffung der Haut mit hochgradiger Runzel- und Faltenbildung. Die Ursache der Krankheit ist nicht genau bekannt, es wird jedoch eine erniedrigte Stabilität der TEL-mRNA oder ein Defizit im Kupfertransport vermutet, so daß die Lysinoxidase nicht mehr funktionell ist (Zhang *et al.*, 1995; Kemppainen *et al.*, 1996).

Die umfangreichen Symptome der aufgeführten Krankheiten lassen schon vermuten, daß Elastin eine extrem wichtige Rolle im tierischen Organismus spielt. Durch das Vorkommen im Bindegewebe ist praktisch jedes Organ, der gesamte Blutkreislauf und das Knochengerüst betroffen, wenn die Synthese der elastischen Fasern durch eine Anomalität auf genetischer Ebene, bei der Biosynthese oder der Proteinverknüpfung beeinträchtigt ist.

1.3 Anwendungsbereiche von Elastin und dessen Komponenten

Durch den technischen Fortschritt der letzten Jahre sind sowohl in der Medizin als auch in der technischen Industrie neue Verfahren und Produkte entwickelt worden, die Materialien mit genau definierten physikalischen und biologischen Eigenschaften erfordern. Medizinisch ist man in der Lage, Gelenke, Blutgefäße und andere Körperbestandteile durch künstliche Nachbildungen zu ersetzen. Die Erfahrungen zeigen jedoch, daß diese Implantate häufig zu unerwünschten Nebenwirkungen führen, die zum Teil erst nach vielen Jahren in Erscheinung treten. Selbst Metalle wie Titan oder hochwertige inerte Kunststoffe führen bei Patienten oft zu drastischen Langzeitschädigungen oder verursachen Allergien, so daß der Wunsch nach organischen Ersatzmaterialien immer zwingender wird. Mittlerweile ist es möglich, Haut- und Knorpelgewebe *in vitro* herzustellen und erfolgreich zu transplantieren. Durch die Verwendung von personenspezifischen Zellen unterbleibt jede Art von Abstoßungsreaktion und anderen Nebenwirkungen, da das Transplantat vom Körper als eigen erkannt wird. Die

fernen Ziele sind durch diese Entwicklung hoch gesteckt worden. Es sollen ganze Organe in Zellkulturen hergestellt werden und funktionsfähig für Transplantationen zur Verfügung stehen. Bis zur Verwirklichung solcher Ideen werden aber sicherlich noch viele Jahre vergehen. Bioelastische Polymere wie Elastin könnten jedoch bereits heute als Grundgerüst genutzt werden, um bestimmte Zelltypen anzuziehen und auf diese Weise die momentan verwendeten synthetischen Materialien ersetzen. Die so hergestellten Gewebe unterliegen aufgrund der langen Haltbarkeit von Elastin nur einer sehr langsamen Degradation und sind völlig biokompatibel, da sie humanen Ursprungs sind (Übersicht in Urry *et al.*, 1993).

Andere Anwendungsbereiche von Elastin sind im Zusammenhang mit alltäglichen Operationen, wie zum Beispiel Bypass- oder Darmoperationen denkbar. Bei der Bypass-Operation werden Blutgefäße transplantiert, um obliterierte Gefäßabschnitte zu überbrücken. Für die Operation ist die Öffnung des Perikardiums nötig, das anschließend häufig nicht wieder korrekt verschlossen werden kann, da durch den Bypass die Herzgröße zugenommen hat. Dadurch kommt es zu Verwachsungen des Epikardiums mit dem Sternum, wodurch weitere Operationen nötig werden. Es wurden zahlreiche künstliche Materialien wie Gore-Tex®, Dacron® und Silikon als perikardiale Ersatzstoffe eingesetzt. Problematisch ist jedoch häufig die Abkapselung der künstlichen Materialien und die damit verbundenen Nebenwirkungen. Deshalb wird diskutiert, ob eine Ummantelung dieser Materialien mit Elastin oder Elastin-ähnlichen Biopolymeren diese Abkapselung verhindern könnte (Urry *et al.*, 1993).

Ein ähnliches Problem entsteht häufig bei Darmoperationen. Nach Entfernung von Darmabschnitten werden die Darmenden aneinandergenäht, wobei sich häufig im Bereich der Anastomose Verwachsungen und Narben entwickeln, die bis zum Darmverschluß führen können und erneut operiert werden müssen. Um die Bildung von Narben und Verwachsungen zu unterbinden, wird seit vielen Jahren nach neuen Materialien gesucht, die diese Sekundärerkrankungen nach Operationen verhindern (Gebelein, 1993). Elastin könnte ein geeigneter Werkstoff sein, da die Elastizität an der Anastomose erhalten bliebe und die Verwendung eines humanen Polymers die Narbenbildung vermindern könnte.

Elastin spielt zudem in der kosmetischen Industrie eine große Rolle, auch wenn das Molekül hier in wissenschaftlich fragwürdiger Art eingesetzt wird. In vielen Anti-Falten-Cremes („Retention Plus“), Masken („Collagen Elastin“, „Collagen Elastin Creme Maske“) und Shampoos („spring-i-ness“) wird Elastin eingearbeitet und als Vitalisierer und Faltenglätter verkauft. Ähnlich ist das auf dem Gebiet der Schönheitschirurgie, die mit Elastinunterspritzungen Falten ausgleicht und Lippenpartien vergrößert. Mittlerweile finden Elastinpräparationen sogar schon Anwendung in der Tiernahrung, wodurch dem Vierbeiner

angeblich eine bessere Knorpel- und Knochenbildung zuteil wird und er kraft- und schwungvoller durch das Leben schreiten kann („Nutraferm Elastin“). Problematisch ist hierbei, daß Elastin momentan ausschließlich aus Kadavern von Rindern und Hühnern isoliert wird. Besonders in Zeiten von BSE und viraler Erkrankungen, die durch solche Verfahrensweisen auf Patienten bzw. Konsumenten übertragen werden könnten, ist das Verwenden so gewonnener Materialien bedenklich.

Aufgrund seiner einzigartigen, reversibel dehnbaren Eigenschaften verfügt Elastin als „Bio-Kunststoff“ über ein hohes wirtschaftliches Potential. Da Elastin *in vivo* kovalent mit Mikrofibrillen verknüpft ist und als unlösliches Polymer in den Zellen vorliegt, kann es aus Vertebraten nur durch chemische Hydrolyse isoliert werden. Die so gewonnenen Elastin-Fragmente sind jedoch nicht mit *in vivo* vorkommenden oder *in vitro* vernetztem Elastin vergleichbar. Damit Materialprüfungen an synthetischem Elastin durchgeführt werden können, ist die Herstellung der beteiligten Proteine Tropoelastin und Lysinoxidase essentiell. Bis heute existiert kein System, mit dem sich beide Proteine in größeren Mengen herstellen lassen. Dies wäre jedoch wünschenswert, um eine umfassende Analyse der möglichen Anwendungsbereiche des Polymers zu ermöglichen. In geringen Mengen kann Tropoelastin sowohl aus Kupfer-defizienten Tierzellen isoliert als auch in Bakterienzellen hergestellt werden. Die so gewonnenen Mengen reichen jedoch für eine umfassende Analyse und erste *in vitro* Vernetzungsversuche nicht aus.

1.4 Synthetische Gene

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines pflanzlichen Expressionssystems zur Herstellung der an der Elastinbildung beteiligten Proteine Tropoelastin und Lysinoxidase. Um eine hohe Expression der Fremdgene im pflanzlichen Organismus zu ermöglichen, sollten zunächst synthetische Gene mit angepaßter „Codon Usage“ hergestellt werden. Perlak *et al.* (1991) konnten nachweisen, daß durch die Anpassung der „Codon Usage“ des *cryIA(b)*-Gens, das für ein Lepidopteren-Toxin aus *Bacillus thuringiensis* kodiert, die Expressionshöhe in Tabak- und Tomatenpflanzen um den Faktor 100 im Vergleich zu dem unveränderten Gen erhöht werden konnte. Dabei zeigte sich allerdings, daß die mRNA-Menge nicht proportional mit dem erhöhten Proteingehalt korrelierte, so daß offensichtlich die DNA-Sequenz nicht nur die Transkription, sondern auch die Translation beeinflusst. Adang *et al.* (1993) konnten durch Verwendung des synthetischen *cryIIIA*-Gens (Coleopteren-Toxin aus *Bacillus thuringiensis*) mit angepaßter „Codon Usage“ ebenfalls die stabile Expression des biologisch aktiven Toxins in transgenen Kartoffelpflanzen erzielen, was mit der unveränderten cDNA nicht gelungen war. Auch in Grünalgen und Bakterien konnten

synthetische Gene erfolgreich exprimiert werden. In diesen Arbeiten wurde aber nicht zwischen dem natürlichen und dem veränderten Gen verglichen (Fuhrmann *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 1995; Au *et al.*, 1998). Aufgrund dieser Daten schien es sinnvoll, die „Codon Usage“ des humanen *LOX*- und des *TEL*-Gens ebenfalls an die des pflanzlichen Organismus anzugleichen.

Durch den Aufbau von Sequenz-Datenbanken sind in den letzten Jahren eine große Anzahl cDNA-Sequenzen aus unterschiedlichen Organismen veröffentlicht worden. Mit diesem Datenbestand wurde statistisch die Häufigkeit der verwendeten Kodons für die einzelnen Aminosäuren ermittelt. Es zeigte sich, daß in jedem Organismus für die einzelnen Aminosäuren spezifische Kodons bevorzugt eingesetzt werden. Außer Methionin und Tryptophan können alle Aminosäuren von zwei bis sechs verschiedenen Triplets kodiert werden. Eine statistisch ausgewogene Verteilung der degenerierten Kodons existiert nicht (Murray *et al.*, 1989). Außerdem wurde deutlich, daß in den einzelnen Organismen der G/C-Gehalt der Gensequenzen variiert. Humane Gene besitzen zum Beispiel durchschnittlich einen G/C-Gehalt von 52,5%, Gene aus Kartoffelpflanzen nur von 42,9%. Als erster Schritt bei der Herstellung der synthetischen *LOX*- und *TEL*-Gene sollte die „Codon Usage“ der humanen DNA-Sequenzen an die von Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum*) angeglichen werden.

Damit die Biosynthese der Fremdproteine nicht negativ beeinflusst wird, sollte weiterhin das Sequenzmotiv AATAAA aus den synthetischen Sequenzen entfernt werden. Dieses Hexanukleotid ist in tierischen Organismen für die korrekte und effiziente Polyadenylierung der mRNA erforderlich (Kessler *et al.*, 1986). Der pflanzliche Polyadenylierungsprozeß ist prinzipiell mit dem tierischen vergleichbar, es gibt jedoch in der Lokalisation der Konsensussequenz Unterschiede (Joshi, 1987). Obwohl der Prozeß der Polyadenylierung in Pflanzenzellen nicht vollständig verstanden ist, sollte die Nukleotidfolge AATAAA vorsichtshalber aus den synthetischen Sequenzen eliminiert werden, um eine fehlerhafte Polyadenylierung und damit die Akkumulation von unvollständigen mRNA-Molekülen zu verhindern.

Ein weiteres, möglicherweise destabilisierendes Motiv ist die Terminations-Sequenz der RNA-Polymerase III. Vankan *et al.* (1988) beschreiben die Sequenz CAN₇₋₉AGTNNA, die in *Arabidopsis thaliana* am 3'-Ende der kodierenden Region von U2 „small nuclear“-RNA gefunden wurde. Da vermutet wird, daß diese Sequenz bei der Termination der Transkription eine essentielle Rolle spielt, sollte dieses Sequenzmotiv ebenfalls aus den Sequenzen der synthetischen Gene entfernt werden.

Außerdem sind für Eukaryoten diverse mRNA Degradationssignale beschrieben worden, die Einfluß auf die mRNA-Stabilität haben (Shaw & Kamen, 1986). Diese Sequenzmotive sind

sehr A/T-reich und beinhalten häufig die Pentamere ATTTA oder ATTAA. Wird die Sequenz ATTTA in die DNA des β -Globins eingefügt, so wird das modifizierte Transkript sehr schnell degradiert (Ohme-Takagi *et al.*, 1993). Um die mRNA-Stabilität der synthetischen Gene nicht zu erniedrigen, sollten A/T-Pentamere in den Sequenzen vermieden werden.

Eukaryotische Gene sind zum großen Teil in Mosaikstrukturen organisiert und bestehen aus Exons mit den kodierenden Sequenzen und dazwischenliegenden Introns. Diese Introns werden durch Spleißen der prä-mRNA entfernt. Die Intron-Exon Übergänge werden durch das Konsensusmotiv AG|GT---AG|G gebildet, wobei die Intronengrenzen durch die senkrechten Striche gekennzeichnet sind (Lou *et al.*, 1993). Dieses Motiv sollte ebenfalls nicht in den DNA-Sequenzen der synthetischen Gene vorkommen.

Um für die Etablierung der Nachweismethoden funktionelle Positivkontrollen zur Verfügung zu haben, wurde versucht, mit anderen Arbeitsgruppen Kooperationen zu vereinbaren. LOX wurde bereits von Ouzzine *et al.* (1996) erfolgreich im *E. coli*-Stamm BL21 exprimiert. Leider konnten die publizierten Ergebnisse von der Gruppe nicht reproduziert werden (persönliche Mitteilung Dr. Hulmes, Institut de Biologie et Chimie des Proteines, Lyon, Frankreich), so daß die Kooperation nicht zu Stande kam.

TEL wurde schon von Indik *et al.* (1990) und Martin *et al.* (1995) rekombinant in *E. coli* produziert. Auch diese Arbeitsgruppen erklärten sich nicht bereit, eine Kontrolle zur Verfügung zu stellen.

Aus diesem Grund sollten in dieser Arbeit beide Proteine zusätzlich rekombinant in der Hefe *Pichia pastoris* und in Bakterienzellen exprimiert werden, um die Nachweis- als auch die Extraktionsmethodik zu etablieren.

2 MATERIAL

2.1 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten Chemikalien wurden im Reinheitszustand p.A. eingesetzt. Die Enzyme wurden nach Herstellerangaben eingesetzt.

Tab. 1: Verwendete Materialien.

Vertreiber	Produkte
Bio-Rad Laboratories, München	Strep-Tag Protein Standard, Critereon Gele, Ready-To-Use Tris/HCl-Gele
BD Biosciences Clontech, Heidelberg	GFP Monoclonal Antibody
Dianova GmbH, Hamburg	AffiniPure Anti-Rabbit IgG AP-konjugiert, AffiniPure Anti-Mouse IgG AP-konjugiert
Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande	Cellulase Onozuka R-10, Gibberellinsäure A3, Naphtylelessigsäure, Zeatinribosid, MS-Salze, Ampicillin, Tetrazyklin, Streptomycin, Spectinomycin, Kanamycin
IBA, Göttingen	Strep-Tactin-Sepharose, Strep-Tactin-AP Konjugat, Anhydrotetrazyklin Hydrochlorid, Strep-Tag Standardprotein
Invitrogen, Groningen, Niederlande	Easy Select <i>Pichia</i> Expression Kit, Zeocin, YNB
Life Technologies, Karlsruhe	Concert Rapid Miniprep System, Concert Rapid Gel Extraction System, T4 DNA Ligase, Platinum <i>Pfx</i> -DNA-Polymerase, <i>Taq</i> -DNA-Polymerase
MBI Fermentas, St. Leon-Rot	Restriktionsenzyme, dNTP, IPTG, X-Gal, DTT, BCIP, NBT
Metabion GmbH, Planegg-Martinsried	Oligonukleotide
Promega, Mannheim	pGEM-Teasy Vector Systems
Qiagen GmbH, Hilden	QIAfilter Plasmid Midi Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAquick Nucleotide Removal Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick PCR Purification, RNeasy Plant Mini Kit, DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen DNA/RNA Midi Kit
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Northern Starter Kit, T3-RNA-Polymerase, CDP- <i>Star</i> , Blocking Reagenz, positiv-geladene Membranen
Sartorius, Göttingen	Vivaspin Concentrator
Seishin Corp, Tokio, Japan	Pectolyase Y23
Sigma-Aldrich, Steinheim	Chemikalien, HABA, Desthiobiotin, Percoll, Magentadosen, Protease Inhibitor Cocktails für Bakterien-, Pflanzen- und Hefezellen, Horseradish Peroxidase, Diaminopentan, BAPN, Homovanillat, Protein A-Sepharose, Kao-Medium, Kao-Vitamine
Stratagene Europe Ltd., Amsterdam, Niederlande	QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, <i>Pfu</i> -DNA-Ligase
Yakult Pharmaceuticals, Tokio, Japan	Cellulase Onozuka RS

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

Tab. 2: Liste der verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	charakteristische Merkmale	Verwendungszweck	Referenz
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF ⁻	Tet ^R	Klonierungen, Überexpression	Bullock <i>et al.</i> , 1987
<i>E. coli</i> BL21	<i>ompT</i>	Überexpression	Amersham Pharmacia
<i>A. tumefaciens</i> EHA101	Rif ^R , Kan ^R	Transformation von Kartoffelpflanzen	Hood <i>et al.</i> , 1993

Tab. 3: Liste der verwendeten Plasmide.

Plasmid	charakteristische Merkmale	Referenz
pBluescript® II SK (pBSK)	Amp ^R	Stratagene
pGEM-T Easy	Amp ^R	Promega
pASK-IBA3	Amp ^R	IBA
pASK-IBA4	Amp ^R , zur periplasmatischen Expression in <i>E. coli</i>	IBA
pASK-IBA5	Amp ^R , zur cytosolischen Expression in <i>E. coli</i>	IBA
pRT100	Amp ^R , 35S-Promotor, 35S-Terminator	Töpfer <i>et al.</i> , 1987
pSR 9-12	pRT100 mit Signalpeptid der leichten Ig-Kette aus Maus	Töpfer <i>et al.</i> , 1987
pBlueSfi BA	pBSK mit veränderter MCS	Hausmann & Töpfer, 1999
pLH9000	Str ^R , Spec ^R , binärer Vektor	Hausmann & Töpfer, 1999
pCATgfp	Amp ^R , <i>gfp</i> , unter Kontrolle des 2x 35S-Promotor, 5'UTR aus TEV	G. Jach, MPIZ Köln
pASK-IBA4-sTEL	<i>sTEL</i> in pASK-IBA4	diese Arbeit
pASK-IBA5-sLOX	<i>sLOX</i> in pASK-IBA5	diese Arbeit
pMPB 2-1	<i>sLOX</i> -Fragment #1 in pMPB 9	diese Arbeit
pMPB 9-1	pRT100 mit veränderter MCS	diese Arbeit
pMPB 9-9	pRT100 mit α -Amylase Signalpeptid aus Gerste, MCS und c-myc Tag	diese Arbeit
pMPB 9-10	<i>sLOX</i> -Fragment #3 in pASK-IBA3	diese Arbeit
pMPB 9-11	<i>sLOX</i> -Fragment #2 in pASK-IBA3	diese Arbeit
pMPB 9-15	pRT100 mit Raps AGPase Signalpeptid, MCS und c-myc Tag	diese Arbeit
pMPB 9-16	vollständige <i>sLOX</i> -Sequenz in pMPB 9	diese Arbeit
pMPB 9-18	pMPB 9-15 mit synthetischer <i>LOX</i> cDNA (plastidäre Lokalisation)	diese Arbeit
pMPB 9-20	<i>sTEL</i> -Fragment #1 in pBlueSfi BA	diese Arbeit
pMPB 9-21	<i>sTEL</i> -Fragment #2 in pBlueSfi BA	diese Arbeit
pMPB 9-22	<i>sTEL</i> -Fragment #3 in pBlueSfi BA	diese Arbeit
pMPB 9-23	pMPB 9-9 mit synthetischer <i>LOX</i> DNA (Sekretion in den Apoplasten)	diese Arbeit
pMPB 9-26	pLH-9000 mit <i>sLOX</i> -Expressionskassette aus pMPB 9-23 (Sekretion in den Apoplasten)	diese Arbeit
pMPB 9-27	pLH-9000 mit <i>sLOX</i> -Expressionskassette aus pMPB 9-18 (plastidäre Lokalisation)	diese Arbeit

pMPB 9-28a	pBlueSfi BA mit <i>sTEL</i> cDNA	diese Arbeit
pMPB 9-28b	pMPB 9-9 mit synthetischer <i>TEL</i> DNA (Sekretion in den Apoplasten)	diese Arbeit
pMPB 9-29	pMPB 9-15 mit synthetischer <i>TEL</i> DNA (plastidäre Lokalisation)	diese Arbeit
pMPB 9-32	pLH-9000 mit <i>sTEL</i> -Expressionskassette aus pMPB 9-28b (Sekretion in den Apoplasten)	diese Arbeit
pMPB 9-35	pASK-IBA5 mit <i>sTEL</i> zur Überexpression in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pMPB 9-37	<i>sLOX</i> -Fragment in pBSK für Herstellung von RNA-Sonden	diese Arbeit
pMPB 9-38	pCATgfp mit synthetischer <i>TEL</i> DNA (plastidäre Lokalisation) und c-myc Tag	diese Arbeit
pMPB 9-39	pLH-9000 mit <i>sTEL</i> -Expressionskassette aus pMPB 9-38 (plastidäre Lokalisation)	diese Arbeit
pMPB 9-40	pMPB 9-9 mit <i>gfp</i> cDNA (Sekretion)	diese Arbeit
pMPB 9-41	pMPB 9-15 mit <i>gfp</i> (plastidäre Lokalisation)	diese Arbeit
pMPB 9-43	pMPB 9-41 mit <i>sLOX</i> (<i>gfp</i> 3'-terminal fusioniert)	diese Arbeit
pMPB 9-46	pMPB 9-41 mit Propeptid und <i>hLOX</i> (<i>gfp</i> 3'-terminal fusioniert)	diese Arbeit
pMPB 9-47	pMPB 9-29 mit <i>sTEL</i> (<i>gfp</i> 3'-terminal fusioniert)	diese Arbeit
pMPB 9-48	pASK-IBA5 mit <i>sLOX</i> zur Überexpression in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pMPB 9-50	pMPB 9-15 mit <i>gfp</i> und <i>sLOX</i> zur transienten Expression in Tabakprotoplasten	diese Arbeit

Die Herstellung der wichtigsten Konstrukte ist in Kapitel 3.13 beschrieben.

2.3 Hefestämme und Plasmide

Tab. 4: Liste der verwendeten *Pichia pastoris* Stämme.

Stamm	charakteristische Merkmale	Verwendungszweck	Referenz
X-33	Wildtyp, mut ⁺	Überexpression	Invitrogen
KM71H	mut ^S	Überexpression	Invitrogen

Tab. 5: Liste der verwendeten Plasmide zur Expression in Hefe.

Plasmid	relevante Merkmale	Referenz
pPICZ-A	Zeo ^R	Invitrogen
pPICZ-B	Zeo ^R	Invitrogen
pPICZ- α -A	Zeo ^R	Invitrogen
pMPB 9-17	Zeo ^R , <i>sLOX</i> zur Sekretion	diese Arbeit
pMPB 9-19	Zeo ^R , <i>sLOX</i> zur cytosolischen Expression	diese Arbeit
pMPB 9-33	Zeo ^R , <i>sTEL</i> zur cytosolischen Expression	diese Arbeit
pMPB 9-34	Zeo ^R , <i>sTEL</i> zur Sekretion	diese Arbeit

2.4 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Tab. 6: Tabelle der verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Verwendungszweck	Basensequenz
RT-s	Sequenzierung	5'-CACTATCCTTCGCAAGACC-3'
RT-as	Sequenzierung	5'-CTGGAGAAAAATAGAGAGAGATAG-3'
IW-35	Amplifizierung AGPase-SP	5'-GATAGCCATGGCGACAATGGCTGC-3'
IW-36	Amplifizierung AGPase-SP	5'-CGAAGTCGACTGCTTTTGGAGAGACGATCGATGGC-3'
Amy-sense	PCR von syn. Amylase-SP + MCS + c-myc Tag	5'-CTTACCATGGATGGGGAAGAACGGCAGCC-3'
Amy-as	PCR von syn. Amylase-SP + MCS + c-myc Tag	5'-TAGAGCTAGCTTATCAATTCAGATCCTCTT-3'
sTEL-as	Amplifikation sTEL	5'-ACATTCTAGACTTTTCTTTCTACCACAGGC-3'
sTEL-s	Amplifikation sTEL	5'-TAAGTCGACAGGAGGTGTCCCAGGAGCCATTCCA-3'
sLOX-Amy-s	sLOX in pMPB 9-9	5'-TGGTGTGCGACTGATGATCCATACAATCCATACAAG-3'
sLOX-Amy-as	sLOX in pMPB 9-9	5'-TGTATCTAGAGTATGGAGAAATAGTACATCCAGAAG
LOXpicz-B-s	sLOX in pPICZ-B	5'-TACAGAATTCAATAATGTCTGATGATCCATACAATCCATACAAG-3'
LOXpicza-A-s	sLOX in pPICZ- α -A	5'-TACAGAATTCGATGATCCATACAATCCATACAAG-3'
LOXpicz-as	sLOX in pPICZ-B/pPICZ- α -A	5'-ACATTCTAGAAGGTATGGAGAAATAGTACATCCAGA-3'
sLOX-AGPase-s	sLOX in pMPB 9-15	5'-TGGTGTGCGACGATGATCCATAC-3'
sLOX-AGPase-as	sLOX in pMPB 9-15	5'-TGTATCTAGAGTATGGAGAAATAGTACATCCAGA-3'
sTEL-mut1	Mutagenese sTEL	5'-CCCATACGGTTACGGACCAGGAGGTGTG-3'
sTEL-mut1as	Mutagenese sTEL	5'-CACACCTCCTGGTCCGTAACCGTATGGG-3'
sTEL-mut2	Mutagenese sTEL	5'-CTGGAGTCGGAGTTGGAGGGATCCCAACTTAC-3'
sTEL-mut2as	Mutagenese sTEL	5'-GTAAGTTGGGATCCCTCCAACCTCCGACTCCAG-3'
AGP-sTEL-myc-s	sTEL in pMPB 9-15	5'-ATGAGTCGACGGAGGTGTCCCAGGAGCCATTCC-3'
sLOX-IBA5-s	sLOX in pASK-IBA5	5'-TCACGAATTCGGATGATCCATACAATCCATACAAG-3'
sLOX-IBA5-as	sLOX in pASK-IBA5	5'-ACTCGGATCCTCATTAGTATGGAGAAATAGTACATCC-3'
sTEL- α -s	sTEL in pPICZ- α -A	5'-TATGAATTCGGAGGTGTCCCAGGAGCCATTCC-3'
sTEL- α -as	sTEL in pPICZ- α -A	5'-AGCATCTAGAACCTTTTCTTTTCTACCACAGGCTTTTC-3'
Hefe-sTEL-s	sTEL in pPICZ-B	5'-TATGAATTCAATAATGTCTGGAGGTGTCCCAGGAGCCATTCC-3'
Hefe-sTEL-as	sTEL in pPICZ-B	5'-AGCAGGGCCCCCTTTTCTTTTCTACCACAGGCTTTTC-3'
T7-as	as-Primer auf T7 Promotor	5'-GAATTGTAATACGACTCACTATAGGG-3'
GFP-Xba-s	gfp in pMPB 9-15	5'-CGTTTCTAGAGGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACT-3'
GFP-Xba-as	gfp in pMPB 9-15/9-9	5'-CGTTTCTAGATTTGTATAGTTTCATCCATGCCATG-3'
GFP-Amy-s	gfp in pMPB 9-9	5'-CGTTTCTAGATGGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACT-3'
Pro-hLOX-s	Propep.-hLOX in pMPB 9-15	5'-CGTTGTCGACGCCCTCCCGCCGCCGCCAACAG-3'
hLOX-Eco-as	Propep.-hLOX in pMPB 9-15	5'-CGTTGAATTCATACGGTGAAATTGTGCAGCCTGAGGCATACGC-3'
mut-gfp-sense	Mutagenese gfp in pMPB 9-50	5'-CTTTCTGTTATGGTGTACAATGCTTTTCAAGATACCCAGATC-3'
mut-gfp-as	Mutagenese gfp in pMPB 9-50	5'-GATCTGGGTATCTTGAAAAGCATTGTACACCATAACAGAA-3'
Sal-GFP-sense	gfp in pMPB 9-15	5'-CGTTGTCGACGGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACT-3'
GFP-Eco-as	gfp in pMPB 9-15	5'-CGTTGAATTCCTTTGTATAGTTTCATCCATGCCATG-3'
sLOX-Eco-s	sLOX in pMPB 9-50	5'-TCACGAATTCGATGATCCATACAATCCATACAAG-3'

2.5 Pflanzen

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden an Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L.) der Sorte Désirée durchgeführt. Die sterile Kultivierung der Pflanzen erfolgte in Klimakammern unter folgenden Bedingungen:

Tag:	16 h	24°C	ca. 70 µE
Nacht:	8 h	20°C	

Pflanzen im Gewächshaus wurden in den Sommermonaten dem natürlichen Tag-/Nachtrhythmus unterstellt. In den Wintermonaten wurden die Pflanzen zusätzlich mit Leuchten der Firma Philipps (SON-T Agro, 400 W) bestrahlt, so daß die Pflanzen immer einer Tageslänge von 12-14 h ausgesetzt waren.

Zur Produktion von Miniknollen wurden Pflanzen aus Gewebekultur in Töpfe (Ø 7 cm) gepflanzt und im Gewächshaus herangezogen. Nach 4 Monaten konnten die Knollen geerntet werden. Jede Pflanze bildete 2-3 Miniknollen von 1-3 cm Durchmesser.

Für die Herstellung von Mesophyll-Protoplasten wurden steril angezogene Tabakpflanzen der Sorte Samsun NN verwendet.

Außerdem wurden Protoplasten aus Tabak BY2-Suspensionskulturen (bright yellow) isoliert. Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. G. Jach (Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln) zur Verfügung gestellt.

2.6 Computergestützte Analysen

Zum Auswerten, Analysieren und Modifizieren von Nukleotid- und Proteinsequenzen wurde das Programm-Paket Lasergene der Firma DNASTAR verwendet. Sequenzvergleiche wurden zusätzlich mit dem Programm Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) berechnet und mit Genedoc (Nicholas *et al.*, 1997) und BioEdit (Hall, 1999) verwaltet.

3 METHODEN

3.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen, die lediglich zur Restriktionsanalyse verwendet werden sollten, erfolgte im Mini-Maßstab durch alkalische Lyse nach der Methode von Birnboim & Doly (1979). Plasmid-Präparationen für Klonierungen und Sequenzierungen wurden mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen) oder mit dem „CONCERT Rapid Miniprep System“ (Life Technologies) durchgeführt.

Die Spaltung von DNA mit Restriktions-Endonukleasen und die Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase wurden nach Herstellerangaben bzw. wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben durchgeführt. Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen).

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen und die anschließende Transformation erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode von Hanahan (1983).

Die Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde in horizontalen Gelen mit TBE als Laufpuffer durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Als Größenstandard diente *Pst* I-geschnittene Lambda-DNA (MBI Fermentas).

Zur Isolierung genomischer DNA aus Pflanzenmaterial wurde der „DNeasy Plant Mini Kit“ der Firma Qiagen verwendet.

3.2 Herstellung synthetischer Gene

3.2.1 Design der synthetischen Sequenz

Die Gene, die für die humane LOX und TEL kodieren, wurden synthetisch hergestellt, um die „Codon Usage“ für die Expression in Pflanzen anzupassen. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurde mit dem Programm SeqEdit (DNASTAR) unter Verwendung der in Kartoffel (*Solanum tuberosum*) und Raps (*Brassica napus*) am häufigsten verwendeten Kodons revers translatiert. Daten über die bevorzugt verwendeten Triplets beider Organismen wurden der Datenbank des Kazusa DNA Research Institute (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) entnommen.

Tab. 7: Vergleich der am häufigsten verwendeten Triplets verschiedener Organismen. In der rechten Spalte sind die zur reversen Translation benutzten Kodons aufgelistet.

Aminosäure	<i>Homo sapiens</i>	<i>E. coli</i>	<i>Brassica napus</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	verwendete Triplets
Ala (A)	GCC	GCC	GCU	GCU	GCU
Cys (C)	UGC	UGC	UGC	UGU	UGU
Asp (D)	GAC	GAU	GAU	GAU	GAU
Glu (E)	GAG	GAA	GAG	GAA	GAA
Phe (F)	UUC	UUU	UUC	UUU	UUU
Gly (G)	GGC	GGC	GGA	GGU	GGA
His (H)	CAC	CAU	CAC	CAU	CAU
Ile (I)	AUC	AUU	AUC	AUU	AUU
Lys (K)	AAG	AAA	AAG	AAG	AAG
Leu (L)	CUG	CUG	CUU	CUU	CUU
Met (M)	AUG	AUG	AUG	AUG	AUG
Asn (N)	AAC	AAC	AAC	AAU	AAU
Pro (P)	CCC	CCG	CCU	CCA	CCA
Gln (Q)	CAG	CAG	CAG	CAA	CAA
Arg (R)	CGG	CGC	AGA	AGA	AGA
Ser (S)	AGC	AGC	UCU	UCU	UCU
Thr (T)	ACC	ACC	ACU	ACU	ACU
Val (V)	GUG	GUU	GUU	GUU	GUU
Trp (W)	UGG	UGG	UGG	UGG	UGG
Tyr (Y)	UAC	UAU	UAC	UAU	UAC
Stop	UGA	UAA	UAA	UAA	UAA

Nach der reversen Translation wurden aus der synthetischen Sequenz alle nicht benötigten Restriktionsschnittstellen entfernt. Zusätzlich wurden Sequenzabfolgen mit negativen Einfluß auf die Expressionsrate eliminiert. Dazu gehören Polyadenylierungs-Stellen (Joshi, 1987; Ohme-Takagi *et al.*, 1993), RNA-Polymerase III Terminationssignale (Vankan *et al.*, 1988), mRNA Degradationssignale (Shaw & Kamen, 1986) und Intron/Exon-Übergänge (Lou *et al.*, 1993). Um spätere „Rearrangements“ durch Rekombination zu verhindern, wurden außerdem alle vorkommenden gegenläufig komplementären und direkten Sequenzwiederholungen („Inverted“ und „Directed Repeats“) von mehr als 10 bp Länge eliminiert.

3.2.2 Strategie der Assemblierung von synthetischen Genen

Die Synthese der Gene erfolgte in < 1 kb Fragmenten nach der Methode von Fuhrmann *et al.* (1999).

Plus-Strang Oligonukleotide (P) wurden HPLC gereinigt und mit Ausnahme des ersten Oligonukleotids 5'-terminal phosphoryliert, während die des Minus-Strangs (M) lediglich entsalzt wurden. Alle Oligonukleotide waren maximal 40 Basen lang. Die M-Oligonukleotide überlappten auf einer Länge von 20 Basen mit zwei aufeinanderfolgenden P-Oligonukleotiden. Durch die anschließende *Pfu*-DNA-Ligase Reaktion wurden ausschließlich die Plus-Strang Oligonukleotide kovalent verknüpft.

Das Prinzip der Assemblierung wird in folgender Abbildung gezeigt:

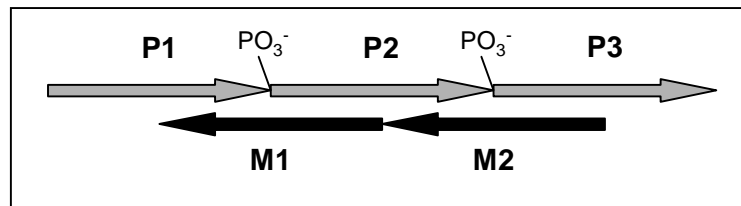


Abb. 2: Schematische Darstellung der Methode zur Herstellung synthetischer Gene nach Fuhrmann *et al.* (1999). Die Oligonukleotide des Plus-Strangs (P1-P3) lagern sich durch die Hilfs-Oligonukleotide M1-M2 in der korrekten Reihenfolge an. Die P-Oligonukleotide werden nach der Assemblierung kovalent verknüpft. (PO_3^-)= Phosphorylierung.

3.2.3 Synthese des Plus-Strangs

Reaktions-Ansatz:

10	µl	Oligonukleotid-Gemisch (je Oligonukleotid 0,36 pmol/µl in TE)
3	µl	10x <i>Pfu</i> -DNA-Ligase Puffer
14	µl	H ₂ O

Der Ansatz wurde 3 min bei 95°C und 3 min bei 80°C im Thermocycler (Trio-Block, Biometra) inkubiert. Danach wurden bei 80°C 3 µl *Pfu*-DNA-Ligase zupipettiert. Um eine optimale Assemblierung der komplementären Oligonukleotide in der korrekten Abfolge zu erreichen, wurde der Ansatz im Thermocycler folgendermaßen inkubiert:

1'	95°C	3 Zyklen
12''	88°C	
12''	80°C	
12''	75°C	
12''	70°C	
12''	67°C	
12''	64°C	
12''	61°C	
12''	58°C	
2 h	55°C	

Anschließend wurde der gesamte Ansatz mit Ethanol gefällt und in 100 µl H₂O resuspendiert. Um vollständig assemblierte Fragmente anzureichern und doppelsträngige DNA-Moleküle zu generieren, wurde eine PCR mit *Pfx*-DNA-Polymerase (Life Technologies) angeschlossen. Als Primer wurden die 5'-terminalen Plus-Strang und Minus-Strang Oligonukleotide eingesetzt. Fragmente richtiger Größe wurden über flankierende Restriktionsschnittstellen kloniert. Mindestens drei positive Klone mit richtiger Fragmentgröße wurden sequenziert. Punktmutationen wurden entweder durch Austausch von Subfragmenten oder durch gerichtete Mutagenese eliminiert.

Für synthetische Gene größer als 1 kb wurden zunächst 200-900 bp lange Fragmente synthetisiert und diese anschließend zusammengefügt.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 mM EDTA

3.3 *in vitro* Mutagenese

Die *in vitro* Mutagenese von Plasmid-DNA wurde mit dem „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden Oligonukleotide verwendet, die sich in 1-3 Basen von der Sequenz des Ursprungs-Plasmids unterschieden. Nach erfolgter Reaktion wurde der Ansatz mit *Dpn* I verdaut und 1 µl der DNA in chemokompetente *E. coli* XL1-Blue transformiert. Jeweils zwei Einzelklone wurden mittels Sequenzanalyse auf den erfolgten Basenaustausch überprüft.

3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Reaktionen wurden im TRIO-Thermoblock TB1 (Biometra) durchgeführt. Standardmäßig wurden zwei verschiedene DNA-Polymerasen verwendet. Die *Taq*-DNA-Polymerase (Life Technologies) wurde zur Optimierung von Reaktionsbedingungen und zur Überprüfung von Klonierungen verwendet. Zur Klonierung amplifizierter DNA-Fragmente wurde die Platinum *Pfx*-DNA-Polymerase (Life Technologies) verwendet.

Ansatz *Taq*-DNA-Polymerase:

10	ng	Template
5	µl	10x <i>Taq</i> -DNA-Polymerase-Puffer
1,5	mM	MgCl ₂
200	µM	dNTP
50	pmol	Primer 1
50	pmol	Primer 2
5	U	Platinum <i>Taq</i> -DNA-Polymerase
		ad 50 µl H ₂ O

Ansatz *Pfx*-DNA-Polymerase :

50	ng	Template
5	µl	10x <i>Pfx</i> -DNA-Polymerase-Puffer
1	mM	MgSO ₄
200	µM	dNTP
50	pmol	Primer 1
50	pmol	Primer 2
2,5	U	Platinum <i>Pfx</i> -DNA-Polymerase
		ad 50 µl H ₂ O

Die Reaktionsansätze wurden mit 50 µl Mineralöl (Sigma) überschichtet. Folgendes Standard-Temperaturprogramm wurde angewendet:

Denaturierung	5'	95°C	
Denaturieren	30''	95°C	} 30 Zyklen
Binden der Primer	1'	55-65°C	
Strangsynthese	1'/kb	72°C (<i>Taq</i>), 68°C (<i>Pfx</i>)	
Strangsynthese	5'	72°C (<i>Taq</i>), 68°C (<i>Pfx</i>)	
	∞	4°C	

3.5 Sequenzanalyse

Alle Sequenzanalysen wurden von einem kommerziellen Anbieter (SequiServe, Vaterstetten) durchgeführt.

3.6 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Als Referenzprotein zur Erstellung der Eichgeraden diente Rinderserumalbumin (BSA).

3.7 SDS-PAGE

Die denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte in vertikalen Tris/HCl-Gelen der Firma Biorad nach der Methode von Laemmli (1970). Die Proteine wurden in SDS-Ladepuffer mit 0,1 M DTT für 5 min bei 95°C denaturiert. Pro Spur wurden bis 100 µg Gesamtprotein geladen. Als Molekularmassenstandard wurde der Strep-Tag Protein Standard (Biorad) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 V.

<u>2x SDS-Ladepuffer:</u>	20	%	Glycerin (v/v)	<u>10x Laufpuffer:</u>	144	g/l	Glycin
	125	mM	Tris/HCl, pH 6,8		30	g/l	Tris
	4	%	SDS (w/v)		1	%	SDS (w/v)
	0,1	g/ml	Bromphenolblau				

3.8 Western-Blot Analyse

Der Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen erfolgte nach der Methode von Burnette (1981). Folgende Puffer wurden verwendet:

<u>Transfer-Puffer:</u>	39	mM	Glycin	<u>TBS(T):</u>	20	mM	Tris-HCl, pH 7,4
	48	mM	Tris		0,5	M	NaCl
	0,0375	%	SDS (w/v)		0,1	%	Tween-20 (v/v) für TBST
	5	%	Methanol (v/v)				

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel 15 min bei Raumtemperatur in Transferpuffer equilibriert. Der Transfer erfolgte in der Multiphor II Blotting Apparatur (Pharmacia) auf Membranen aus Nitrozellulose (Schleicher & Schuell) oder PVDF (Millipore) bei einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. Der erfolgreiche Proteintransfer wurde durch reversible Ponceau-Färbung (0,2% (w/v) in 3% TCA (v/v)) nachgewiesen. Nach Entfärben der Membran mit TBST wurden unspezifische Bindungsstellen mit Hilfe von 3% Gelatine (w/v) in TBS abgesättigt. Die Inkubation erfolgte für mindestens 1 h bei Raumtemperatur.

3.8.1 Immunologischer Nachweis

Alle Antikörper-Lösungen wurden in 1% Gelatine (w/v) in TBS angesetzt. Der immunologische Nachweis erfolgte durch 2 h Inkubation bei Raumtemperatur mit dem spezifischen Antikörper. Anschließend wurden ungebundene Antikörper durch jeweils 5 min Waschen in TBS, TBST und TBS entfernt. Als Zweit-Antikörper dienten an Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelte IgG, in denen die Membran 1 h geschüttelt wurde. Nach erneutem Waschen (s.o.) wurde die Membran 5 min in AP-Puffer equilibriert und zum Starten der AP-Reaktion das Farbreagenz zugegeben. Die Farbreaktion wurde nach 1-10 min mit H_2O gestoppt.

<u>AP-Puffer:</u>	100	mM	Tris-HCl, pH 9,5
	100	mM	NaCl
	50	mM	MgCl_2

<u>Farbreagenz:</u>	45	μl	Nitroblue Tetrazolium Salz (75 mg/ml) in 70% Dimethylformamid
	35	μl	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat (50 mg/ml) in 100% Dimethylformamid
	10	ml	AP-Puffer

Folgende Antikörper-Kombinationen wurden eingesetzt:

Tab. 8: Liste der verwendeten Antikörperkombinationen.

1. Antikörper	Referenz	2. Antikörper	Referenz
anti-TEL (polyklonal) 1:1000	J. Rosenbloom, University of Pennsylvania, Philadelphia	AP-Ziege-anti-Kaninchen-IgG; 1:5000	Dianova
anti-LOX (polyklonal) 1:400	K. Csiszar, University of Hawaii, Hawaii	AP-Ziege-anti-Kaninchen-IgG; 1:4000	Dianova
anti-GFP (monoklonal) 1:500	Clontech	AP-Ziege-anti-Maus-IgG; 1:3000	Dianova
anti-c-myc (Klon 9E10.2) 1:1000	Sigma	AP-Ziege-anti-Maus-IgG; 1:3000	Dianova

3.8.2 Nachweis mit Strep-Tactin-AP-Konjugat

Proteine mit Strep-Tag wurden mit Hilfe des Strep-Tactin-AP-Konjugats der Firma IBA detektiert. Hierfür wurde das Konjugat nach dem Blockieren der Membran 1:4000 in 1% Gelatine (w/v) in TBS verdünnt und 30 min mit der Membran inkubiert. Überschüssiges Konjugat wurde durch je 5 min Waschen in TBS, TBST und TBS entfernt. Die Farbreaktion erfolgte direkt im Anschluß wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben.

3.9 Sandwich-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Mit Hilfe des Sandwich-ELISA wurden Proteinextrakte transgener Pflanzen und transformierter Protoplasten auf Expression von Tropoelastin oder GFP untersucht.

Zum Absättigen der Oberflächen der Slots einer Mikrotiterplatte (Mikrolon, Greiner) wurde je nach Anwendung entweder TEL- oder GFP-Antiserum (Invitrogen) verwendet. Das „Coating“ erfolgte mit 100 µl der verdünnten Antikörper-Lösung (0,01 µg/µl in 1x PBS) über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung entfernt und die Slots 5x mit 200 µl T-PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden für 2 h mit 3% Gelatine in PBS bei 37°C blockiert. Nach Wiederholung der Waschschrte (s.o.) wurden in jeden Slot 100 µl Proteinextrakt (bis zu 500 µg lösliches Protein) pipettiert. Pro Probe wurden drei Parallelwerte ermittelt. Die Extrakte wurden für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und die Slots wieder gewaschen. Zur Detektion wurde der monoklonale c-myc Antikörper (Sigma, 1:1000 in 1% Gelatine) verwendet. Pro Slot wurden 100 µl pipettiert und die Ansätze für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Inkubation mit 100 µl 1:1000 verdünnten AP-gekoppelten Ziege-Anti-Maus IgG Antikörper (Dianova) für 1,5 h. Anschließend wurden die Slots 3x mit 200 µl T-PBS gewaschen und für die AP-Reaktion mit 1 M Diethanolamin (pH 9,8) equilibriert. Danach wurden 100 µl Substratlösung hinzugegeben und die Platte für 30-45 min im Dunkeln inkubiert. Die Farbentwicklung wurde im Spektrophotometer (SpectraMax 340PC, Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen und dokumentiert.

<u>1x PBS:</u>	8	g	NaCl	<u>T-PBS:</u>	0,05	%	Tween-20 (v/v)
	0,2	g	KCl				in 1x PBS
	1,44	g	Na ₂ HPO ₄				
	0,24	g	KH ₂ PO ₄				
			ad 1 l H ₂ O, pH 7,4				
<u>Substratlösung:</u>	2	mM	4-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz				
	1	M	Diethanolamin				
			pH 9,8				

3.10 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation wurde unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, da das verwendete TEL-Antiserum spezifisch denaturierte TEL-Moleküle erkennt. 10 mg Protein A-Sepharose wurden in 400 µl TBS, 1% Triton X-100 und 0,2% SDS für mindestens 15 min vorgequollen. Zur Immunpräzipitation wurden 90 µl Proteinextrakt (Proteingehalt ca. 1-5 µg/µl) mit 10 µl 10% SDS vermischt und für 5 min bei 100°C inkubiert. Danach wurden 337,5 µl TBS und 62,5 µl 10% Triton X-100 zugefügt und 2 min bei 65°C erhitzt. Ausgefallene Proteine wurden durch Zentrifugation (10 min, 10400 rpm) abgetrennt. Dem Überstand wurden 2,5 µl TEL-Antiserum zugesetzt und der Ansatz für 2 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Extrakt mit der Sepharose gemischt und zur Bindung der Antikörper an Protein A für 1 h bei 4°C gerollt. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen der Protein A-Sepharose mit 1x mit 1 ml TBS, 1% Triton X-100, 0,2% SDS, 1x mit 1 ml TBS, 1% Triton X-100 und 1x mit 1 ml TBS entfernt. Nach Abnehmen des Überstands wurden die TEL-Antikörper Konjugate durch Zugabe von 20 µl 2x SDS-Ladepuffer und 2 µl 1 M DTT bei 95°C (5 min) denaturiert. Danach erfolgte die Western-Blot Analyse der Proben.

3.11 Reinigung von Tropoelastin

Die Reinigung von TEL mit N-terminalem Strep-Tag II erfolgte durch Affinitätschromatographie. Als Säulenmatrix wurde 1 ml Strep-Tactin-Sepharose (IBA) verwendet. Alle Reinigungsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Säulenmatrix wurde mit 5 ml Puffer W (100 mM Tris, 1 mM EDTA; pH 8,0) equilibriert. Zur Adsorption der Proteine sind 15 ml Rohextrakt auf die Säule gegeben und der Säulendurchlauf vollständig aufgefangen worden. Danach wurde die Matrix mit 5x 1 ml Puffer W gewaschen. Die Elution des Zielproteins erfolgte durch 6x 0,5 ml Puffer E, der den spezifischen Kompetitor Desthiobiotin in einer Konzentration von 2,5 mM enthielt. Zur Regeneration der Matrix wurde die Säule 3x mit 5 ml Puffer R (1 mM HABA [2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoic acid] in Puffer W) gespült.

3.12 LOX-Aktivitätstest

Die Aktivität der Lysinoxidase wurde mit einem Peroxidase-gekoppelten Enzymtest nach Trackman *et al.* (1981) bestimmt. Als Substrat für LOX wurde Diaminopentan eingesetzt. Bei diesem Test wird das durch LOX-Aktivität entstehende H₂O₂ durch die nachfolgende Peroxidasereaktion zur Oxidation von Homovanillat verwendet. Das oxidierte Produkt kann fluorimetrisch nachgewiesen werden.

Der Standardtest erfolgte bei 42°C in 0,05 M Natrium-Borat, pH 8,2 mit 0,25 mg Homovanillat, 40 µg Meerrettich Peroxidase und 20-50 µl LOX-Extrakt aus *E. coli* oder *Pichia pastoris*. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,01 M 1,5-Diaminopentan gestartet und die Entwicklung des fluoreszierenden Produkts im Spektrofluorimeter (SpectraMax Gemini XS, Molecular Devices) 30 min verfolgt.

3.13 Klonierungsstrategien

Bei Klonierung von Fragmenten, die über PCR amplifiziert wurden, erfolgte immer eine Kontrollsequenzierung. Die Amplifizierung der Fragmente wurden mit *Pfx*-DNA-Polymerase (Life Technologies) durchgeführt.

3.13.1 Bakterielle Strep-Tag II-Expressionsvektoren

Für die Fusion der synthetischen Gene mit einem N-terminalem Strep-Tag II wurden die Vektoren pASK-IBA4 und pASK-IBA5 (IBA) verwendet. Zur Expression cytosolisch lokalisierter Proteine wurde der Vektor pASK-IBA5 und zur periplasmatischen Sekretion pASK-IBA4 benutzt. Die Sekretion erfolgte durch das *ompA*-Signalpeptid, das im periplasmatischen Raum durch eine spezifische Signal-Peptidase abgespalten wird.

3.13.2 *sTEL*-Konstrukte

Die synthetische *TEL*-Sequenz wurde mittels PCR mit geeigneten Primern so adaptiert, daß am 5'-Ende eine *Eco* RI-Schnittstelle und am 3'-Ende ein Stop-Kodon und eine *Xho* I-Erkennungssequenz eingefügt wurden. Das amplifizierte Fragment wurde über *Eco* RI und *Xho* I in die Vektoren pASK-IBA4 und pASK-IBA5 kloniert, um die Vektoren pASK-IBA4-*sTEL* und pMPB 9-35 zu erhalten.

3.13.2.1 *sLOX*-Konstrukte

Die Klonierung erfolgte analog zu 3.13.2. Die PCR wurde mit den Oligonukleotiden *sLOX*-IBA5-s und *sLOX*-IBA5-as durchgeführt und über die eingeführten *Eco* RI- und *Bam* HI-Erkennungssequenzen in den Vektor pASK-IBA5 kloniert. Es resultierte der Vektor pMPB 9-48.

3.13.3 Klonierung der Plasmide zur Expression von TEL und LOX in Kartoffelpflanzen

Zur Expression von TEL im Apoplasten der Pflanzenzellen wurde die synthetische Sequenz unter Kontrolle des 35S-Promotors und Terminators des Blumenkohlmosaikvirus (Odell *et al.*, 1985) gestellt. Für die Sekretion des Fremdproteins in den Apoplasten wurde das α -Amylase Signalpeptid aus Gerste (Rogers & Milliman, 1983) verwendet. Zum späteren

Nachweis der rekombinanten Proteine wurde an den C-Terminus von TEL das c-myc-Epitop als Detektions-Tag (Evan *et al.*, 1985) fusioniert.

Zunächst wurde der Vektor pMPB 9-9 konstruiert. Bei diesem Vektor handelt es sich um ein pRT100-Derivat, das neben der Promotor/Terminator-Kassette zusätzlich das α -Amylase Signalpeptid, eine Klonierungsstelle und den c-myc Tag mit Stop-Kodon enthält. Signalpeptid, Klonierungsstelle und Tag wurden synthetisch assembliert, das Fragment mit den Oligonukleotiden Amy-sense und Amy-as amplifiziert und mit den Enzymen *Nco* I/*Nhe* I nachgeschnitten. Die Klonierung erfolgte in *Nco* I und *Xba* I-linearisierten pRT100. *Nhe* I und *Xba* I bilden kompatible Enden, sind aber nach der Ligation von beiden Restriktions-Endonukleasen nicht mehr zu schneiden.

Wenn die Insertion der Expressionskassetten in die T-DNA des binären Vektors ungerichtet erfolgte, wurde die Orientierung der Kassetten anschließend überprüft und das Konstrukt ausgewählt, bei dem Fremdgen und *nptII*-Gen in Tandem-Orientierung angeordnet waren.

3.13.3.1 Expression von LOX im Apoplasten

Die synthetische LOX DNA wurde mit den Oligonukleotiden sLOX-Amy-s und sLOX-Amy-as amplifiziert und über die flankierenden *Sal* I/*Xba* I-Erkennungssequenzen in den Vektor pMPB 9-9 kloniert, um Plasmid pMPB 9-23 zu erhalten. Die Expressionskassette wurde nach Restriktion mit *Hin* dIII isoliert, in den binären Vektor pLH9000 kloniert und das resultierende Plasmid pMPB 9-26 genannt.

3.13.3.2 Expression von LOX in Plastiden

Im Vektor pMPB 9-9 wurde das α -Amylase Signalpeptid gegen das ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase) Signalpeptid aus *Brassica napus* ausgetauscht (Zawodny & Martini, 2000). Die AGPase Signalsequenz wurde mit den Primern IW-35 und IW-36 amplifiziert und über *Nco* I/*Sal* I in pMPB 9-9 inseriert, wobei das α -Amylase Signalpeptid deletiert wurde (= pMPB 9-15).

Die sLOX DNA wurde mit den Primern sLOX-AGPase-s und sLOX-AGPase-as amplifiziert und über die Schnittstellen *Sal* I/*Xba* I in den Vektor pMPB 9-15 kloniert (= pMPB 9-18). Die Expressionskassette wurde über einen *Hin* dIII-Verdau isoliert und in pLH9000 kloniert (= pMPB 9-27).

3.13.3.3 Expression von TEL im Apoplasten

Um die synthetische TEL-Sequenz mit dem α -Amylase Signalpeptid zu fusionieren, wurde die sTEL-DNA durch Restriktion mit den Enzymen *Sal* I/*Xba* I aus dem Plasmid pMPB 9-28a geschnitten und in pMPB 9-9 kloniert (= pMPB 9-28b). Danach wurde die sTEL-

Expressionskassette über einen partiellen *Hin* dIII-Verdau isoliert und in den binären Vektor pLH9000 kloniert (= pMPB 9-32).

3.13.3.4 Expression von TEL in Plastiden

Die synthetische *TEL*-Sequenz wurde mit den Oligonukleotiden AGP-sTEL-myc-s und sTEL-as amplifiziert und über die *Sal*I/*Xba*I Erkennungssequenzen in den Vektor pMPB 9-15 kloniert (= pMPB 9-29).

Die *sTEL*-Sequenz mit AGPase-Signalpeptid und c-myc Tag wurde über *Nco*I und *Hin* dIII (partial) aus pMPB 9-29 isoliert und in den Vektor pCATgfp inseriert. Dieser Vektor enthält einen 2x verstärkten 35S-Promotor mit der 5' UTR („untranslated region“) aus TEV („tobacco etch virus“) (= pMPB 9-38). Die Expressionskassette aus pMPB 9-38 wurde über einen *Hin* dIII-Partialverdau isoliert und in den binären Vektor pLH9000 kloniert (= pMPB 9-39).

3.13.4 Herstellung der *Pichia pastoris* Expressionsvektoren

3.13.4.1 Expression von LOX im Cytosol

Die synthetische *LOX*-Sequenz wurde durch PCR amplifiziert und an den Enden durch Anfügen von Restriktionsschnittstellen modifiziert. Als Oligonukleotide wurden LOXpicz-B-s und LOXpicz-as eingesetzt. Die amplifizierte DNA wurde mit den Restriktions-Endonukleasen *Eco*RI/*Xba*I nachgeschnitten und in den Vektor pPICZ-B kloniert (= pMPB 9-19).

3.13.4.2 Sekretion von LOX ins Medium

sLOX wurde mit dem Primerpaar LOXpicz-A-s und LOXpicz-as mittels PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *Eco*RI/*Xba*I in den Vektor pPICZ- α -A kloniert (= pMPB 9-17).

3.13.4.3 Expression von TEL im Cytosol

Die *sTEL*-Sequenz wurde über PCR mit den Oligonukleotiden Hefe-sTEL-s und Hefe-sTEL-as amplifiziert und über *Eco*RI und *Bsp* 120I in pPICZ-A kloniert (= pMPB 9-33).

3.13.4.4 Sekretion von TEL ins Medium

Die synthetische *TEL* DNA wurde mit den Primerpaar sTEL- α -s und sTEL- α -as durch PCR amplifiziert und mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI/*Xba*I nachgeschnitten. Durch die überhängenden Enden erfolgte die Ligation in den Vektor pPICZ- α -A. Es entstand der Vektor pMPB 9-34.

3.13.5 GFP-Fusionsproteine

Für alle GFP-Konstrukte wurde der 35S-Promotor und -Terminator verwendet. Für den Import in die Plastiden wurde das AGPase-Signalpeptid und für die Sekretion in den Apoplasten die α -Amylase-Signalsequenz verwendet.

3.13.5.1 Vorkonstrukt mit AGPase-Signalpeptid

Die *gfp*-Sequenz wurde mit den Oligonukleotiden GFP-Xba-s und GFP-Xba-as durch PCR amplifiziert. Als Matrizen-DNA wurde das Plasmid pCATgfp eingesetzt. Die amplifizierten Fragmente wurden mit *Xba* I nachgeschnitten und ungerichtet in pMPB 9-15 ligiert. Die korrekte Orientierung wurde durch Restriktions-Analyse bestimmt (= pMPB 9-41). pMPB 9-41 enthält die Expressionskassette mit 35S-Promotor, AGPase-Signalpeptid und c-myc Tag.

3.13.5.2 Plastidär lokalisierte TEL:GFP-Fusion

Die *gfp*-Sequenz wurde mit *Xba* I aus dem Vektor pMPB 9-41 geschnitten und das isolierte Fragment (750 bp) in pMPB 9-29 kloniert. Die korrekte Orientierung des *gfp* in dem resultierenden Plasmid pMPB 9-47 wurde durch Restriktions-Analyse überprüft.

3.13.5.3 Plastidär lokalisierte LOX:GFP-Fusion

Das *gfp* wurde durch Restriktion mit *Xba* I aus dem Vektor pMPB 9-41 isoliert und in pMPB 9-18 ligiert. Die Insertion in richtiger Orientierung wurde durch Restriktions-Analyse getestet (= pMPB 9-43).

3.13.5.4 Plastidär lokalisierte GFP:LOX-Fusion

Für die Fusion der DNA-Sequenzen wurde zunächst *gfp* mit den Oligonukleotiden Sal-GFP-sense und GFP-Eco-as amplifiziert und über die angefügte *Sal* I und *Eco* RI-Schnittstelle in den Vektor pMPB 9-15 kloniert. In das entstandene Plasmid wurde im darauffolgenden Schritt die sLOX-DNA eingefügt. Hierfür wurde sLOX mit den Oligonukleotiden sLOX-Eco-s und sLOX-AGPase-as amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *Eco* RI und *Xba* I subkloniert. Die Sequenzanalyse zeigte, daß im *gfp* eine Punktmutation enthielt, die zu einem Aminosäureaustausch führte. Daher wurde mit den Primern mut-gfp-sense und mut-gfp-as das Plasmid *in vitro* mutagenisiert und der erfolgreiche Basenaustausch durch eine abschließende Sequenzanalyse überprüft (= pMPB 9-50).

3.13.5.5 Plastidär lokalisierte Propeptid:hLOX:GFP-Fusion

Die cDNA der humanen *LOX*-Sequenz einschließlich des Propeptids wurde durch PCR mit den Primern Pro-LOXH-s und hLOX-Eco-as amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *SaI* / *Eco* RI in pMPB 9-41 kloniert (= pMPB 9-46).

3.14 Kulturen von *E. coli*-Zellen

Alle *E. coli* Kulturen wurden bei 37°C in LB-Medium angezogen. Feste Medien enthielten 15 g Agar pro Liter. Wenn erforderlich, wurden folgende Antibiotika hinzugefügt:

Ampicillin (Amp): 100 mg/l

Tetrazyklin (Tet): 12,5 mg/l

LB-Medium: 10 g Bacto-Trypton
5 g Bacto-Yeast Extrakt
10 g NaCl
ad 1 l H₂O, pH 7,0

3.15 Strep-Tag Expressionssystem

3.15.1 Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

Für die Herstellung von Positivkontrollen in XL1-Blue oder BL21 wurde das Strep-Tag Expressionssystem der Firma IBA verwendet. Es wurden immer neu transformierte Klone für die Fremdgenexpression verwendet.

Für Expressionskulturen wurde eine Übernachtskultur 1:100 in frisches Medium überimpft und im Schüttelinkubator bei 28, 30 oder 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 0,2 µg/ml Anhydrotetrazyklin (AHT) erfolgte die Induktion des *tetA*-Promotors. Die optimalen Induktionsbedingungen wurden für alle Fremdproteine getrennt ermittelt. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation (5000 xg, 4°C, 10 min) sedimentiert und bei -20°C gelagert.

3.15.2 Aufschluß von *E. coli*-Zellen

Zum Aufschluß wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und in 1/10 Kulturvolumen Puffer W (50 mM Tris, 1 mM EDTA; pH 8,0) resuspendiert. Danach wurde das Homogenat 3x 30 s sonifiziert (Sonorex Super; Stufe 4, 50% Impulsdauer) und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (10000 xg, 10 min) abgetrennt. Der Überstand wurde für weitere Analysen verwendet.

3.16 Kultur und Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens EHA 101 (Hood *et al.*, 1993) wurde standardmäßig in YEB-Medium nach Vervliet *et al.* (1975) bei 28°C angezogen. Antibiotika wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Kanamycin: 25 mg/l
Streptomycin: 25 mg/l
Spectinomycin: 100 mg/l

YEB-Medium: 0,5 % Fleischextrakt (w/v)
0,5 % Hefeextrakt (w/v)
0,5 % Bacto Trypton (w/v)
0,5 % Saccharose (w/v)
2 mM MgCl₂
pH 7,0

Die Herstellung chemokompetenter Zellen und die Transformation erfolgte nach Höfgen & Willmitzer (1988).

3.17 *Pichia pastoris* Expressionssystem

Zur Expression von rekombinanten Proteinen in Hefezellen wurde der „Easy Select *Pichia* Expression Kit“ der Firma Invitrogen verwendet. Alle Hefekulturen wurden bei 28-30°C angezogen. Zur Expression wurden die Stämme X-33 und KM71H eingesetzt. Bei X-33 handelt es sich um den Wildtyp, der zwei intakte Alkoholoxidase-Gene (AOX) besitzt. Dieser Stamm kann auf Medium mit Methanol als einziger Kohlenstoffquelle uneingeschränkt wachsen (mut⁺ = „methanol utilization positive“). KM71H trägt hingegen nur ein funktionelles AOX-Gen und zeigt daher den Phänotyp mut^S („methanol utilization slow“), der sich durch deutlich langsames Wachstum auf Methanol-haltigem Medium von X-33 unterscheidet. Vom Hersteller wird empfohlen, die Fremdgenexpression sowohl in einem mut⁺ als auch in einem mut^S-Stamm durchzuführen, da einer der Phänotypen sich besser zur Expression eignen könnte. Um sicherzustellen, daß nach der Transformation der Stämme keine Veränderung des mut-Phänotyps durch homologe Rekombination der auf den Plasmiden enthaltenen 3'AOX1-Region mit dem Wildtyp-AOX1-Gen stattgefunden hat, wurden die mut-Phänotypen der Transformanten bestimmt.

3.17.1 Herstellung und Transformation kompetenter Hefezellen

Die Herstellung kompetenter Zellen und die anschließende Transformation wurden die Zellen in YPD angezogen und nach dem EasyComp-Protokoll der Firma Invitrogen präpariert.

<u>YPD:</u>	1	%	Yeast Extract
	2	%	Peptone
	2	%	Glucose
	2	%	Agar (bei Bedarf)
	100	µ/ml	Zeocin (bei Bedarf)

3.17.2 Expression im mut⁺-Stamm X-33

Nach Bestimmung des mut-Phänotyps auf MDH-Platten wurden 10 mut⁺ Einzelkolonien für erste Expressionsversuche angezogen. Hierfür wurden 25 ml BMGY-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 28°C geschüttelt. Nach Bestimmung der OD₆₀₀ wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (3000 xg, 5 min) und in BMMY resuspendiert, wobei eine OD₆₀₀=1 eingestellt wurde. Alle 24 h wurde als Probe 1 ml Kultur entnommen, wobei bei intrazellulärer Expression die sedimentierten Zellen, bei extrazellulärer Expression das Medium eingefroren wurde. Der Expressionskultur wurde täglich 100% Methanol zu einer Endkonzentration von 0,5% zugefügt. Die Expression wurde über 4 Tage verfolgt.

<u>MDH:</u>	1,34	%	YNB (w/v)
	4x10 ⁻⁵	%	Biotin (w/v)
	2	%	Dextrose (w/v)
	15	g/l	Agar

<u>BMMY:</u>	1	%	Yeast Extract (w/v)
	2	%	Peptone (w/v)
	100	mM	Kaliumphosphat
	1,34	%	YNB (w/v)
	4x10 ⁻⁵	%	Biotin (w/v)
	0,5	%	Methanol (w/v)
			pH 6,0

<u>BMGY:</u>	1	%	Yeast Extract (w/v)
	2	%	Peptone (w/v)
	100	mM	Kaliumphosphat
	1,34	%	YNB (w/v)
	4x10 ⁻⁵	%	Biotin (w/v)
	1	%	Glycerin (w/v)
			pH 6,0

Die Proben wurden durch Western-Blot Analyse auf Fremdgenexpression überprüft. Bei Nachweis von Fremdprotein wurde von dem entsprechendem Klon eine Glycerinkultur angelegt.

3.17.3 Expression im mut^S-Stamm KM71H

Nach Bestimmung des mut-Phänotyps wurden 10 unabhängige mut^S-Einzelklone zur Expression eingesetzt. Eine Einzelkolonie wurde in 100 ml BMGY angeimpft und bei 28°C bis zu einer OD₆₀₀=2-6 geschüttelt. Nach Ernte der Zellen durch Zentrifugation (3000 xg, 5 min) wurden die Zellen zur Induktion der Expression in 1/5 Volumen der Ausgangskultur in

BMMY resuspendiert. Alle 24 h wurde 1 ml Kultur als Probe entnommen und Methanol zu einer Endkonzentration von 0,5% zugefügt. Die Expression wurde über 6 Tage verfolgt.

3.17.4 Aufschluß von Hefezellen

Die Zellen wurden in 1/10 Kulturvolumen Hefe-Aufschlußpuffer resuspendiert. Der Aufschluß erfolgte durch 5x 1 min Schütteln mit Glasperlen (0,45-0,55 mm) im „Bead Beater“ (Hamilton) für präparative Anwendungen oder im Eppendorf-Reaktionsgefäß für analytische Zwecke. Nach dem Aufschluß wurde der Hefe-Extrakt 20 min bei 14000 xg zentrifugiert und der Überstand für weitere Versuche verwendet.

<u>Hefe-Aufschlußpuffer:</u>	50	mM	Natriumphosphat (monobasisch)
	1	mM	EDTA
	5	%	Glycerin (v/v)
	50	µl/g	Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)
			pH 7,4

3.17.5 Analyse des Mediums nach extrazellulärer Expression in Hefezellen

Für die Analyse der extrazellulär exprimierten Proteine wurden die Hefezellen zuerst durch Zentrifugation sedimentiert und die Proteine im Medium durch Ultrafiltration angereichert. Für die Ultrafiltration wurden „Vivaspin Concentrators“ (Sartorius) mit einem Ausschluß von 10 kDa verwendet und das Volumen auf 1/50 reduziert. Die angereicherte Fraktion wurde im Western-Blot analysiert.

3.18 Isolierung von Gesamt-RNA aus Blattmaterial

Gesamt-RNA wurde mit dem „RNeasy Plant Mini Kit“ der Firma Qiagen isoliert. Für die Isolierung wurden ca. 100 mg Blattmaterial von Kartoffelpflanzen geerntet und in Flüssig-Stickstoff gemörsert. Nach der Isolierung wurde der RNA-Gehalt der Proben photometrisch bei 260 nm bestimmt. Um Verunreinigungen durch Proteine und Zucker auszuschließen, wurde außerdem das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} bestimmt. Bei sauberen RNA-Präparationen lag das Verhältnis bei 2,0. Die Lagerung erfolgte in Ethanolfällung bei -80°C .

3.19 Northern-Blot Analyse

Die Herstellung der Sonden, die Hybridisierung und die Detektion wurde mit dem DIG Northern Starter Kit der Firma Roche durchgeführt.

3.19.1 Herstellung von antisense RNA-Sonden

3.19.1.1 sTEL-Sonde

Für die Herstellung der *TEL*-Sonde von der synthetischen Sequenz wurde das Plasmid pMPB 9-28a (*sTEL*) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben mit T3-RNA-Polymerase und 1 µg linearisierter Matrizen-DNA. Die korrekte Größe (~ 2 kb) der synthetisierten DIG-markierten RNA wurde im Agarosegel abgeschätzt.

3.19.1.2 sLOX-Sonde

Die Herstellung der *sLOX*-Sonde erfolgte über PCR von dem Plasmid pMPB 9-37 mit den Oligonukleotiden *sLOX*-IBA5-s und T7-as mit anschließender *in vitro* Transkription. Das amplifizierte Fragment (0,8 kb) wurde isoliert und 150 ng in die *in vitro* Transkription eingesetzt. Die Synthese der RNA-Sonde erfolgte nach Herstellerangaben durch die T7-RNA-Polymerase. Die erfolgreiche Reaktion wurde durch Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

3.19.2 Elektrophorese und Detektion

Die Auftrennung von hitzedenaturierter Gesamt-RNA in formaldehydhaltigen Agarosegelen und der Kapillartransfer auf Nylonmembran erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989). Die RNA wurde im UV-Crosslinker (120.000 µJ/cm²) mit der Nylonmembran kreuzvernetzt. Die Detektion erfolgte mit CDP-*Star* (Roche). Die Membran wurde im Lumi-Imager (Biorad) für 5 min exponiert.

3.20 Transformation von Kartoffelblättern und pflanzliche Gewebekultur

Die sterile Kultivierung von Kartoffelpflanzen erfolgte auf 2 MS-Medium nach Murashige & Skoog (1962) in Magenta Plastikboxen (Sigma). Im Abstand von vier bis sechs Wochen wurden Kopfstecklinge in frisches Medium umgesetzt. Für alle Anwendungen wurden Kartoffelpflanzen der Sorte Désirée verwendet.

Für die Transformation wurden Blätter von etwa vier Wochen alten Kartoffelpflanzen aus steriler Gewebekultur geerntet und die Mittelrippe herausgeschnitten. Die Blattstücke wurden mit der Oberseite auf 10 ml 2-MS-Medium in Petrischalen gelegt. Nach Zugabe von 50 µl einer Agrobakterien über-Nacht-Kultur wurden die Schalen 2 min vorsichtig geschwenkt und danach 2 Tage im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Induktion der Kallusbildung wurden die Blattstücke auf Kallusinduktionsmedium (CIM) gesetzt. Nach 7 Tagen auf CIM wurden die Blattstücke zur Sproßinduktion auf Sproßinduktionsmedium (SIM) überführt und

wöchentlich auf frisches Medium gesetzt. Sich entwickelnde Sprosse wurden bei einer Länge von etwa 3 cm vom Kallus abgetrennt und in CK-Medium gesteckt. Transgene Pflanzen wurden kontinuierlich auf CK-Medium gehalten.

<u>2 MS-Medium:</u>	4,4 g	M+S-Salze	<u>SIM:</u>	2 mg/l	Zeatinribosid
	1 g	MES		20 µg/l	NAA
	20 g	Saccharose		20 µg/l	GA ₃
		ad 1 l H ₂ O, pH 7,5		250 mg/l	Claforan
				50 mg/l	Kanamycin
					in 1,6 MS-Medium

<u>1,6 MS-Medium:</u>	4,4 g	M+S-Salze	<u>CK-Medium:</u>	250 mg/l	Claforan
	1 g	MES		50 mg/l	Kanamycin
	16 g	Glucose			in 2 MS-Medium
	8 g	Agar			
		ad 1 l H ₂ O, pH 7,5			

<u>CIM:</u>	5 mg/l	NAA
	0,1 mg/l	BAP
	250 mg/l	Claforan
	50 mg/l	Kanamycin
		in 1,6 MS-Medium

3.21 Analyse transgener Pflanzen

3.21.1 Aufschluß von Blattgewebe

100 bis 200 mg Blattmaterial wurden geerntet und in 100 µl Protein-Extraktionspuffer mit einer Spatelspitze PVPP homogenisiert (IKA RW 16 basic Homogenisator). Der Extrakt wurde 2x 10 min bei 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand für nachfolgende Analysen verwendet.

<u>Extraktionspuffer:</u>	50 mM	HEPES, pH7,5
	2 mM	Natriumbisulfit
	0,1 %	SDS (w/v)
	40 µl/g Zellen	Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)

3.21.2 Aufschluß von Knollengewebe

Pro Linie wurden zwei verschiedene Knollen verwendet und aus der mittleren Region jeweils 2 Scheiben geschnitten (ca. 4-7 g). Das Knollengewebe wurde im Verhältnis 1:1 mit PEXP versetzt, mit einem Ultraturrax (IKA) homogenisiert und für 10 min bei 4000 rpm, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend noch mal bei 13000 rpm, 4°C für 10 min zentrifugiert.

<u>PEXP:</u>	2	mM	Natriumbisulfit	<u>1x PBS:</u>	8	g	NaCl
	0,1	%	Triton X-100 (v/v)		0,2	g	KCl
	40	µl/g	Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)		1,44	g	Na ₂ HPO ₄
			in 1x PBS, pH 7,5		0,24	g	KH ₂ PO ₄
							ad 1 l H ₂ O, pH 7,4

3.21.3 Isolierung von Plastiden

Für die Isolierung von Plastiden wurden 2 Blätter von 4 Wochen alten Gewächshaus-Pflanzen verwendet. Alle Versuchsschritte erfolgten bei 4°C. Von den geernteten Blättern wurde die Mittelspreite entfernt und das Gewebe in 2 ml Isolationsmedium in einer Petrischale auf Eis kleingehackt. Der Pflanzenbrei wurde anschließend durch zwei Lagen Miracloth filtriert und der filtrierte Extrakt mit 500 µl 30% Percoll (in Isolationsmedium) unterschichtet. Nach Zentrifugation (4 min, langsam von 2000 auf 5000 rpm beschleunigen) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Waschpuffer (Isolationsmedium ohne MgCl₂ und BSA) mit einem feinen Haarpinsel resuspendiert. Die Plastiden wurden durch Zentrifugation (4 min, 5000 rpm) sedimentiert und noch einmal gewaschen. Die sedimentierten Organellen wurden abschließend in 100 µl 10 mM Tris, 0,5% (v/v) Triton X-100, pH 8,0 resuspendiert und dabei durch osmotischen Schock aufgeschlossen. 100 µg des Extrakts wurden im Western-Blot analysiert.

<u>Isolationsmedium:</u>	50	mM	HEPES
	400	mM	Sorbitol
	10	mM	MgCl ₂
	0,1	%	BSA (w/v), entfettet
			pH 8,0

3.22 Transiente Transformation von Protoplasten

3.22.1 Protoplasten aus Tabakblättern

3.22.1.1 Präparation von Protoplasten

Für die Isolierung von Mesophyll-Protoplasten wurden ca. 4-6 Wochen alte Tabakpflanzen (Samsun NN) verwendet. In eine Petrischale wurde 12 ml Enzymlösung vorgelegt und von den geernteten Blättern die Mittelrippe entfernt. In der Enzymlösung wurden die Blatthälften fächerartig eingeschnitten und über Nacht im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Petrischale ca. 1 h langsam geschüttelt, um Protoplasten aus dem Gewebe zu lösen. Die Suspension wurde durch eine Stahlsiebkomination (250 µm, 100 µm) filtriert und die Siebe 2x mit 12 ml W5-Medium nachgewaschen. Anschließend wurden die Protoplasten in Schraubdeckelröhrchen überführt und 5 min bei 60 xg, 10°C, zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit einer Pasteurpipette auf

5 ml CPW20S-Medium geschichtet und nochmals für 10 min zentrifugiert. Intakte Protoplasten wurden vorsichtig abgenommen, in ein neues Schraubdeckelröhrchen überführt und mit 8 ml W5-Medium versetzt. Die Proben wurden erneut sedimentiert (5 min, 60 xg) und die Anzahl der isolierten Protoplasten in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Für die anschließende Transformation wurde eine Konzentration von $6,6 \times 10^6$ Protoplasten/ml in MaMg-Lösung eingestellt.

3.22.1.2 PEG-Transformation der isolierten Protoplasten

Für jedes Konstrukt wurden 20 µg DNA in eine beschichtete Petrischale (Ø 5 cm) vorgelegt, 300 µl Protoplasten-Suspension zugefügt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 600 µl PEG-Lösung in Tropfen von je 125 µl zu den Protoplasten getropft und 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Verdünnung der PEG-Lösung erfolgte in 5 Schritten mit je 500 µl Kao-Medium. Zwischen den Verdünnungsschritten wurde jeweils 5 min gewartet. Die Protoplasten wurden über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und am nächsten Tag im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

<u>W5-Medium:</u>	125 mM	CaCl ₂	<u>CPW:</u>	10 mM	CaCl ₂
	100 mM	NaCl		0,2 mM	KH ₂ PO ₄
	10 mM	KCl		1 mM	KNO ₃
	2,5 mM	MES		1 mM	MgSO ₄
		pH 5,6-5,8; 650 mOs		1,3 mM	MES
					pH 5,6-5,8
<u>CPWM:</u>	80 g/l	Mannit	<u>CPW20S:</u>	200 g/l	Saccharose
		ad 1 l CPW; 529 mOs			ad 1 l CPW; 810 mOs
<u>MaMg:</u>	0,3 M	Mannit	<u>PEG-Lösung:</u>	0,4 M	Mannit
	0,1 M	MgCl ₂		0,1 M	Ca(NO ₃) ₂
	0,01 M	MES		0,1 %	MES (w/v)
		pH 5,6; 604 mOs			pH ≥ 7
				400 g/l	PEG 6000
<u>Enzym-Lösung:</u>	1 %	Cellulase (w/v)	<u>Kao-Medium:</u>	3,7 g	Kao-Salzmischung
	0,3 %	Maceroenzym (w/v)		1 ml	Kao-Vitamin-Lösung (100x)
		in CPWM		500 mg	myo-Inositol
				60 g	Glucose
				1 mg	2,4-D
				0,1 mg	NAA
				0,1 mg	BAP
					pH 5,6-5,8

3.22.2 Protoplasten aus Tabak-Suspensionskulturen

3.22.2.1 Isolierung von Protoplasten aus BY2-Suspensionskultur

Um Protoplasten aus einer BY2 Tabak-Suspensionskultur zu isolieren, wurden 4 Tage zuvor 50 ml BY2-Medium mit 2,5 ml einer 1 Woche alten Suspensionskultur angeimpft und bei

26°C leicht geschwenkt. Am vierten Tag wurde die Kultur in ein steriles Plastikröhrchen überführt und 5 min bei 100 xg zentrifugiert. Die Zellen wurden in 25 ml S-Enzymlösung vorsichtig resuspendiert, in eine Petrischale (Ø 20 cm) pipettiert und für 2 h im Dunkeln bei 60 rpm inkubiert. Mit einer abgeschnittenen Pipette wurden je 5 ml der protoplastierten Zellen in Schraubdeckelröhrchen mit jeweils 5 ml W5-Medium pipettiert. Nach Zentrifugation (2 min, 100 xg) wurde der Überstand fast vollständig abgenommen, die Zellen im Restüberstand durch Schwenken resuspendiert und in 10 ml W5-Medium vereinigt. Die Anzahl der Protoplasten wurde in einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert und in S-MaMg-Medium auf eine Konzentration von $6,6 \times 10^6$ Protoplasten/ml resuspendiert.

3.22.2.2 PEG-Transformation der Protoplasten aus BY2-Suspensionkultur

In eine beschichtete Petrischale (Nunc) wurden 20 µg DNA pipettiert und 600 µl S-PEG-Lösung in 5 Tropfen um die DNA verteilt. 300 µl der Protoplasten-Suspension wurden auf die DNA gegeben, leicht vermischt und für 5 min inkubiert. Danach wurden die PEG-Tropfen mit den Protoplasten gemischt und für 20-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 10 ml W5-Medium zu den Zellen pipettiert und jeweils 5 ml der Lösung in ein Schraubdeckelröhrchen mit 5 ml W5-Medium überführt. Nach Zentrifugation (4 min, 100 xg) wurden die sedimentierten Zellen beider Röhrchen in insgesamt 5 ml Kao-Medium resuspendiert und in eine Petrischale pipettiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Dunkeln bei 26°C.

<u>BY2-Medium:</u>	4,3 g	M+S-Salze	<u>S-Enzymlösung:</u>	1 %	Cellulase Onozuka RS (w/v)
	2 g	MES		0,1 %	Pectolyase Y23 (w/v)
	30 g	Saccharose		0,4 M	Mannitol
	200 mg	KH ₂ PO ₄			pH 5,5
	1 mg	Thiamin-HCl (frisch)			
	100 mg	myo-Inositol (frisch)			
	0,2 mg	2,4-D (frisch)			
		ad 1 l H ₂ O, pH 5,8			
<u>S-MaMg-Medium:</u>	450 mM	Mannitol	<u>S-PEG-Lösung:</u>	25 %	PEG 1500 (w/v)
	15 mM	MgCl ₂		100 mM	MgCl ₂
	0,1 %	MES (w/v)		450 mM	Mannitol
		pH 5,6		20 mM	HEPES
					pH 6,0

3.22.2.3 Aufschluß von Protoplasten

Die Protoplasten eines Transformations-Ansatzes wurden durch Zentrifugation (4 min, 100 xg) sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 100 µl Extraktionspuffer (siehe 3.21.1) resuspendiert und 30 s sonifiziert. Unlösliche Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (13000 rpm, 10 min) abgetrennt und der lösliche Proteinextrakt für die Analyse mittels Western-Blot oder Sandwich-ELISA verwendet.

3.22.2.4 Analyse des Mediums zum Nachweis von sekretierten Proteinen

Die Protoplasten wurden durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand für weitere Analysen verwendet. Um die Proteine aus dem Medium aufzukonzentrieren, erfolgte ein Anreicherungsschritt durch Ultrafiltration (vgl. 3.17.5). Das Volumen wurde dadurch auf 1/80 verringert.

3.22.3 Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Protoplasten wurden mit einem Zeiss Axioskop Mikroskop betrachtet, das mit einer 100 Watt-Quecksilberdampf Lampe HBO 103 für Fluoreszenzanwendungen ausgestattet war. Als Filter fanden das Filter Set 09 der Firma Zeiss (Anregung: BP 450-490 nm, Emission: LP 515) und der GFP Filter F41-017 der Firma AHF (Anregung: HQ 470/40, Emission: HQ 525/50) Anwendung.

4 ERGEBNISSE

4.1 Lysinoxidase (LOX)

4.1.1 Herstellung des synthetischen *LOX*-Gens (*sLOX*) mit angepaßter „Codon Usage“

4.1.1.1 Design der synthetischen Sequenz

Bei der Erstellung der synthetischen Sequenz wurde der reife Proteinteil der humanen Lysinoxidase (Mariani *et al.*, 1992) verwendet. Signalpeptid und Propeptid wurden nicht berücksichtigt.

Nach der reversen Translation der reifen Aminosäuresequenz wurden Restriktionsschnittstellen eingefügt oder eliminiert (Abb.3) und Sequenzmuster, die negativen Einfluß auf die Proteinbiosynthese haben könnten, entfernt (siehe Kapitel 3.2.1).

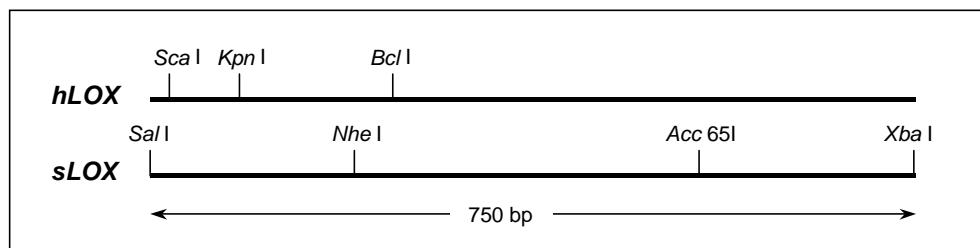


Abb. 3: Schematischer Vergleich der Lage von Restriktionsschnittstellen auf den Sequenzen der humanen (*hLOX*) und synthetischen *LOX* (*sLOX*). Die in der humanen Sequenz dargestellten Erkennungssequenzen wurden eliminiert und neue in die synthetische DNA eingefügt.

Der G/C-Gehalt humaner Gene liegt durchschnittlich bei 52,5%, der Gehalt von Genen aus Kartoffelpflanzen dagegen nur bei 42,9%. Durch die Anpassung der „Codon Usage“ wurde der G/C-Gehalt an den pflanzlichen Organismus angepaßt. Humane *LOX* weist einen G/C-Gehalt von 49,5% auf, in der synthetischen Sequenz wurde er auf 36,7% erniedrigt. Die resultierende DNA-Sequenz war 76% mit der humanen Sequenz identisch.

Zur Fusion der drei Subfragmente wurde zunächst Fragment #3 über *Acc* 65I/*Xba* I aus pMPB 9-10 in den Vektor pMPB 9-11 kloniert. Aus dem resultierenden Vektor pMPB 2-2 wurde Fragment #2/#3 durch *Sal* I/*Xba* I-Verdau isoliert und in pMPB 2-1 ligiert. Das Endkonstrukt pMPB 9-16 enthielt die vollständige synthetische LOX-Sequenz einschließlich Signalpeptid. Durch eine abschließende Sequenzanalyse wurde die Gesamtsequenz noch einmal verifiziert.

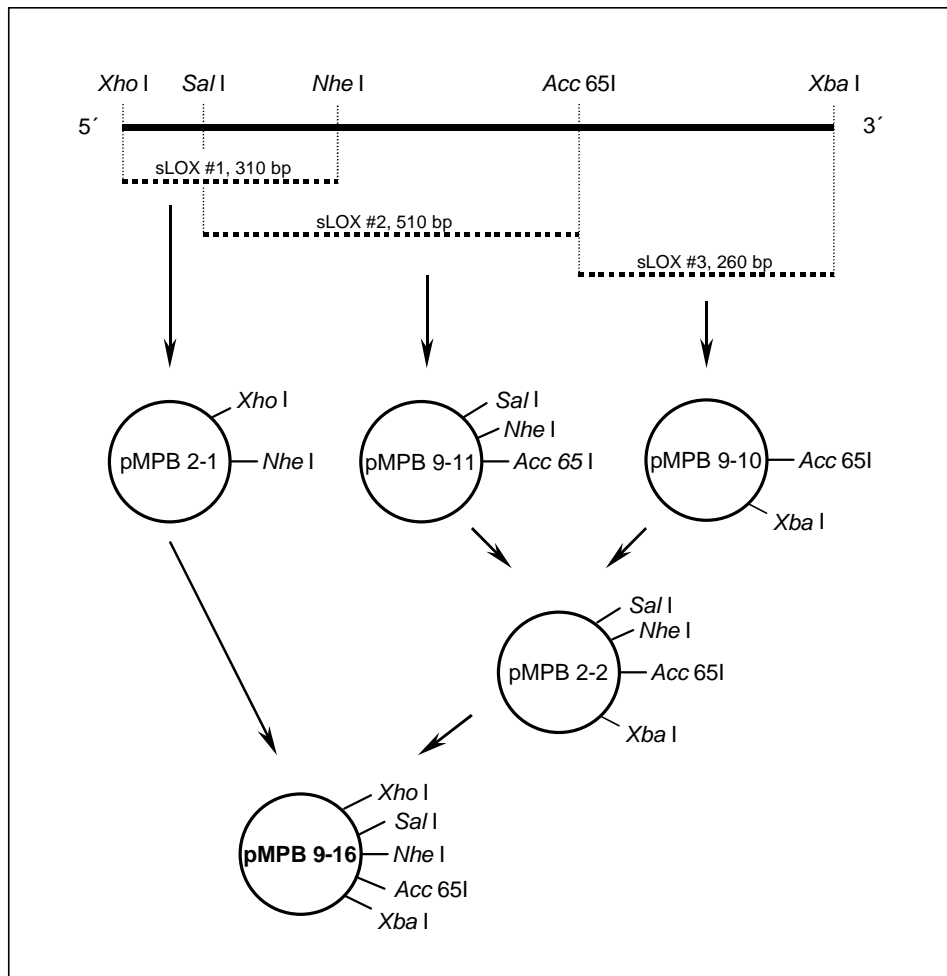


Abb. 5: Schematische Darstellung der Klonierungsschritte zur Assemblierung des synthetischen LOX-Gens. Das Signalpeptid aus Maus Myelomzellen befindet sich zwischen der *Xho* I und *Sal* I Schnittstelle. In die synthetische Sequenz wurden 5 Restriktionsschnittstellen für die spätere Assemblierung der DNA-Fragmente eingefügt. Nach der Klonierung der drei Einzelfragmente erfolgten zwei Assemblierungsschritte. Der Vektor pMPB 9-16 enthält das vollständige synthetische Gen.

4.1.2 Etablierung eines Systems zur Herstellung von LOX als Positivkontrolle

Um ausreichende Proteinmengen zur Etablierung der Nachweismethodik zur Verfügung zu haben, sollte das Enzym entweder im Hefe- oder im bakteriellen System exprimiert werden.

Zudem sollte der fluorimetrische LOX-Aktivitätstest etabliert werden, um diesen später für das Testen der transgenen Pflanzen einsetzen zu können.

4.1.2.1 Expression von LOX in Hefe

Zur Expression von der synthetischen LOX in *Pichia pastoris* wurden die Vektoren pMPB 9-17 und pMPB 9-19 verwendet (Abb.6).

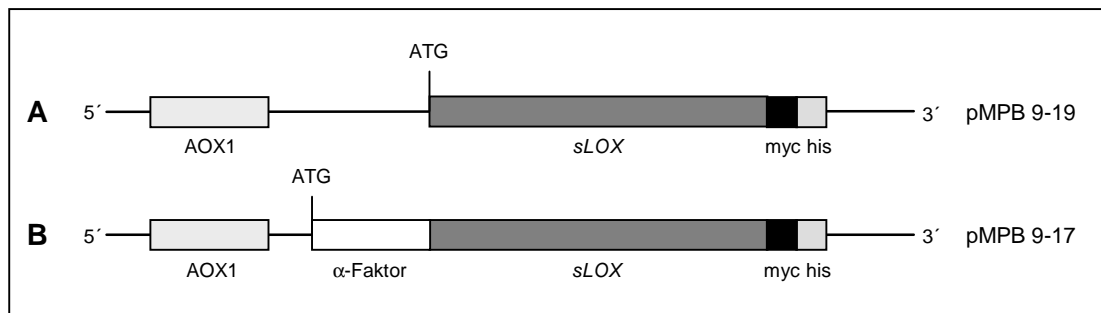


Abb. 6: Expressionskassetten für die Synthese von LOX in *Pichia pastoris*. Die Expressionskassetten beider Konstrukte stehen unter der Kontrolle des AOX1-Promotors. Am 3'-Ende der sLOX-Sequenz sind in beiden Vektoren die kodierenden DNA-Sequenzen für den c-myc- und den (his)₆-Tag fusioniert. **(A)** Konstrukt zur intrazellulären Expression, **(B)** Konstrukt zur extrazellulären Expression. Die Sekretion wird durch die 5'-terminale Signalsequenz des α-„Mating“-Faktors aus (**α-Faktor**) *Saccharomyces cerevisiae* vermittelt. **(AOX1)** AOX1 Promotor, **(sLOX)** synthetische LOX-Sequenz, **(myc)** c-myc Tag, **(his)** (His)₆ Tag, **(ATG)** Startkodon.

4.1.2.1.1 Sekretion von LOX ins Medium

Zur extrazellulären Expression von LOX wurde pMPB 9-17 in die *Pichia pastoris*-Stämme X-33 und KM71H transformiert. Nach Bestimmung des mut-Phänotyps wurden je 10 mut⁺ X-33-Klone und 10 mut^S KM71H-Klone auf Expression untersucht. Nach der Induktion durch Zugabe von Methanol wurden im Abstand von 24 h 1 ml-Proben entnommen und die Expression über einen Zeitraum von vier (mut⁺) bzw. sechs (mut^S) Tagen verfolgt. Nach Zentrifugation wurden Proteine des Mediums durch Ultrafiltration aufkonzentriert und im Western-Blot analysiert. Die Detektion rekombinanter LOX erfolgte mit einem monoklonalen c-myc Antikörper. In keinem der getesteten mut⁺- und mut^S-Klonen konnte LOX nachgewiesen werden.

4.1.2.1.2 Intrazelluläre Expression von LOX

Zur intrazellulären Expression von LOX wurde die gleiche Strategie wie in Kapitel 4.1.2.1.1 beschrieben verfolgt. Für die Western-Blot Analyse wurde in diesem Fall jedoch nicht der Kulturüberstand verwendet, sondern die lösliche Proteinfraction nach Aufschluß der Zellen in die Analyse eingesetzt.

Es zeigte sich, daß keine der mut^+ X-33-Klone unter den gewählten Bedingungen LOX produzierten. In den analysierten mut^S KM71H-Klonen konnte jedoch bei zwei Klonen rekombinantes Protein im Western-Blot nachgewiesen werden. Klon #11 zeigte 72 h nach Induktion die höchste Fremdproteinakkumulation. Als Positivkontrolle wurde bei der Antikörper-Detektion ein Einzelketten-Antikörper mit c-myc Tag eingesetzt (Abb. 7).

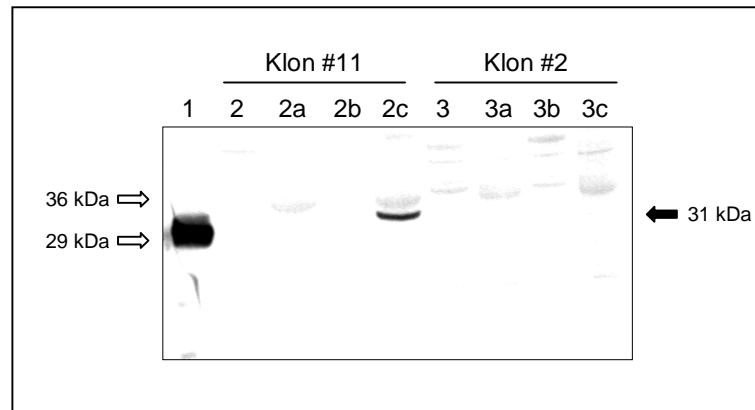


Abb. 7: Western-Blot Analyse von zwei KM71H:pMPB 9-19 Klonen. Als Positivkontrolle wurde ein Einzelketten-Antikörper mit C-terminalem c-myc Tag eingesetzt. (1) Positivkontrolle, (2) Klon #11 0 h, (2a) Klon #11 24 h, (2b) Klon #11 48 h, (2c) Klon #11 72 h, (3) Klon #2 0 h, (3a) Klon #2 24 h, (3b) Klon #2 48 h, (3c) Klon #2 72 h.

Mit Klon #11 wurden weitere Optimierungsversuche durchgeführt, um die Fremdgenexpression weiter steigern zu können. Da durch Vergrößerung des Kulturvolumens häufig die Expressionsmenge stark erhöht werden kann (Invitrogen, persönliche Mitteilung), wurde Klon #11 nach „Scale-Up“-Protokoll im zehnfachen Volumen angezogen, induziert und die Hefezellen nach 72 h geerntet. Durch diesen Ansatz konnte die produzierte Fremdproteinmenge jedoch nur unwesentlich erhöht werden.

Tab. 9: Zusammenfassung der LOX-Expressionsversuche in den *Pichia pastoris*-Stämmen X-33 und KM71H.

Konstrukt	X-33 (mut^+)		KM71H (mut^S)	
	Zahl getesteter Klone	Expression	Zahl getesteter Klone	Expression
pMPB 9-17 (sekretiert)	10	0/10	10	0/10
pMPB 9-19 (intrazellulär)	10	0/10	10	2/10

4.1.2.2 Expression von LOX in *E. coli*

Um ein alternatives und weniger aufwendiges Expressionssystem zu testen, wurde LOX zusätzlich in Bakterienzellen exprimiert. Die verwendeten Strep-Tag II Expressionsvektoren tragen die Promotor/Operator-Region des *tetA*-Resistenzgens. Der *tet*-Repressor, dessen Expression unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors steht, bindet an den *tetA*-

Promotor und verhindert auf diese Weise die Fremdgenexpression unter nicht-induzierten Bedingungen. Erst durch Zugabe des Induktors Anhydrotetracyklin wird die Expression des Fremdgens initiiert.

Für die Expression der LOX in *E. coli* wurde der Vektor pASK-IBA5-sLOX (Abb. 8) in den Bakterienstamm XL1-Blue transformiert.

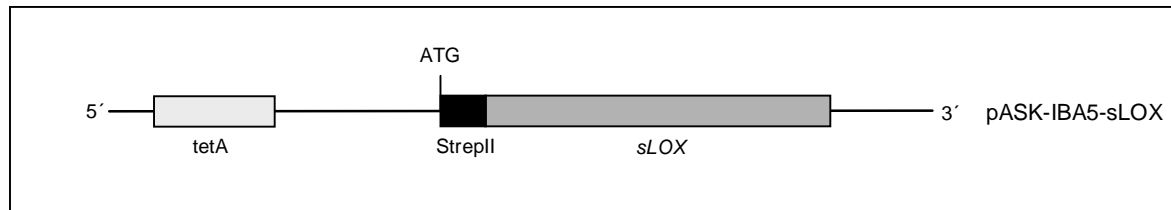


Abb. 8: Schematische Darstellung der Expressionskassette in pASK-IBA5-sLOX zur cytosolischen Expression der LOX in *E. coli*. (**tetA**) tetA-Promotor, (**StrepII**) Strep-Tag II, (**sLOX**) synthetische LOX-Sequenz, (**ATG**) Startkodon.

Zunächst wurden drei unabhängige Klone XL1-Blue:pASK-IBA5-sLOX induziert und auf Fremdgenexpression untersucht. Nach Induktion der Zellen bei $OD_{550}=0,4-0,7$ wurden stündlich 1 ml-Proben entnommen und die OD_{550} bestimmt. Die sedimentierten Zellen wurden aufgeschlossen und die löslichen Proteine im Western-Blot analysiert. Zur Detektion wurde an Strep-Tactin gekoppelte Alkalische Phosphatase verwendet.

Erfolgte die Inkubation der Expressionskulturen bei 37°C, konnte in keiner Probe (1, 2, 3, 4 und 18 h nach Induktion) Fremdprotein nachgewiesen werden. Bei Erniedrigung der Inkubationstemperatur auf 30°C wurden jedoch geringe LOX Mengen produziert (Daten nicht gezeigt). Das Expressionsmaximum lag bei 2 h. Auffällig war das deutlich verlangsamte Wachstum der Bakterien nach der Induktion im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle (Abb. 9).

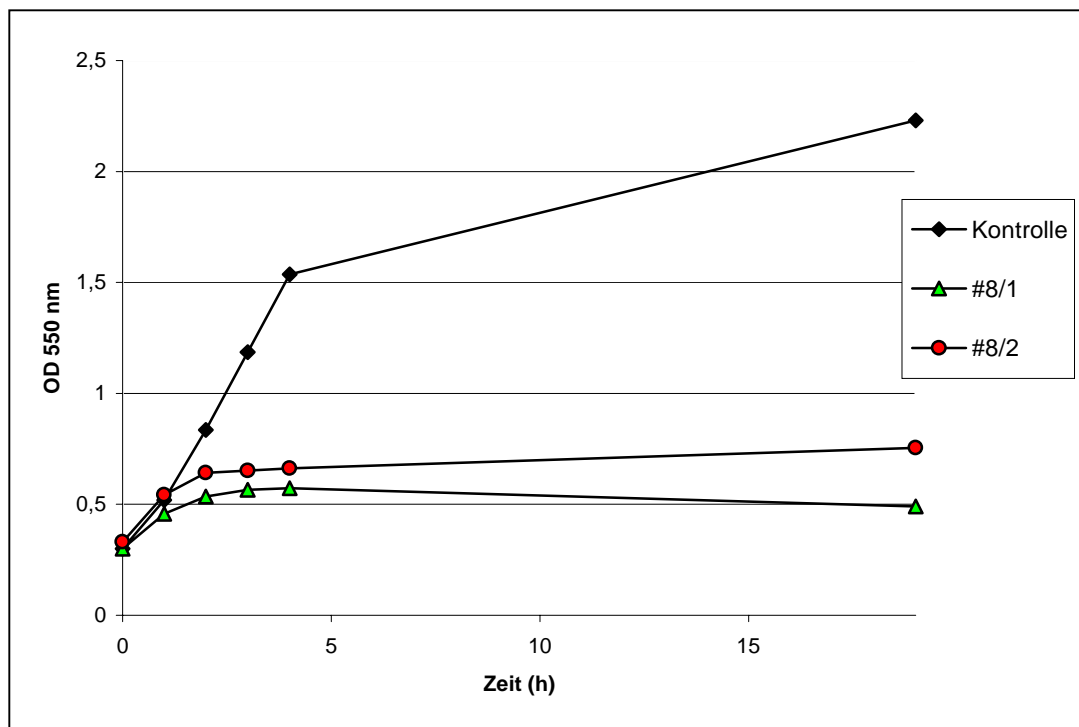


Abb. 9: Wachstumskurve von zwei unabhängigen induzierten XL1-Blue:pASK-IBA5-sLOX Klonen im Vergleich mit einer nicht-induzierten Kontrolle. Die Kulturen wurden bei 30°C inkubiert und zum Zeitpunkt des 0 h-Werts induziert. (**Kontrolle**) Klon #8; nicht induziert, (**#8/1**) Klon #8 Expressionskultur 1; induziert, (**#8/2**) Klon #8 Expressionskultur 2; induziert.

Alternativ wurden Expressionsversuche in dem *E. coli*-Stamm BL21 durchgeführt. Im Gegensatz zu XL1-Blue zeigten die Expressionskulturen dieses Stammes auch nach der Induktion keine reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit. Nach Induktion bei 28°C wurde in der Western-Blot Analyse ein deutliches Signal detektiert, das im untersuchten Zeitraum von 1 h bis 4 h nach Induktion gleich stark blieb (Abb. 10).

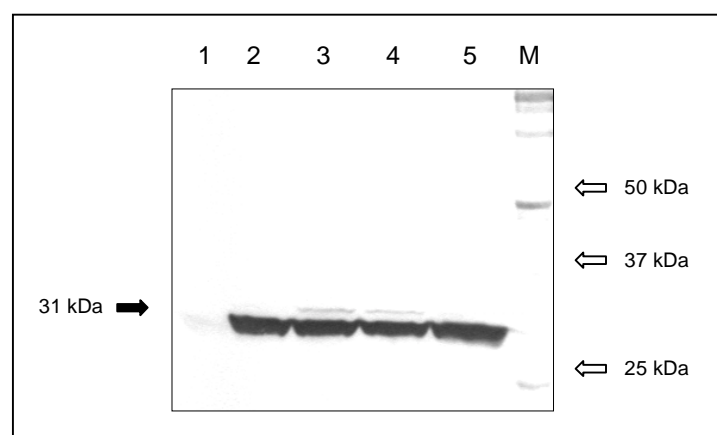


Abb. 10: Western-Blot Analyse der LOX-Expression in BL21. (1) Zellextrakt vor Induktion, (2) 1 h nach Induktion, (3) 2 h nach Induktion, (4) 3 h nach Induktion, (5) 4 h nach Induktion, (M) Molekularmassenstandard. Aufgetragen sind Extraktmengen, die jeweils 1 ml Bakterienkultur (OD₅₅₀=0,4) entsprechen. Die Entwicklung des Western-Blots erfolgte mit Strep-Tactin gekoppelter Alkalischer Phosphatase.

Um den löslichen Anteil der LOX in den Zellen zu bestimmen, wurden die nach 1 h geernteten Zellen in lösliche und unlösliche Protein-Fraktion aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Wie sich herausstellte, lag bereits eine Stunde nach Induktion über die Hälfte des Fremdproteins in unlöslicher Form in den Bakterienzellen vor (Abb. 11).

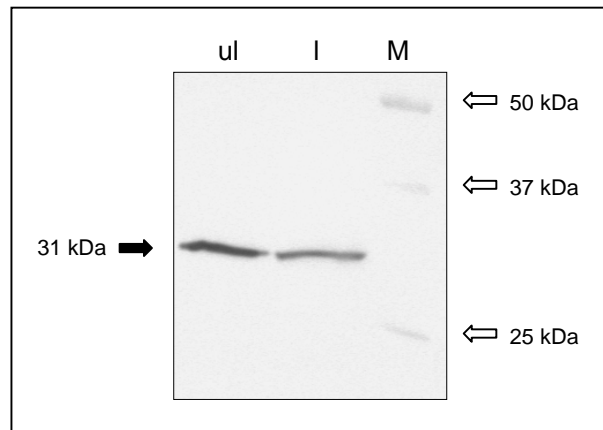


Abb. 11: Western-Blot Analyse induzierter BL21-Zellen nach Auftrennung in lösliche und unlösliche Protein-Fraktion. (**ul**) unlösliche Fraktion, (**l**) lösliche Fraktion, (**M**) Molekularmassenstandard. Aufgetragen wurden Extraktmengen, die jeweils 1 ml Bakterienkultur ($OD_{550}=0,15$) entsprechen.

Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse wurde zur Expression von LOX im bakteriellen System der Stamm BL21 verwendet. Die Kulturen wurden bei 28°C inkubiert und 1 h nach Induktion geerntet. Für den LOX-Aktivitätstest wurde der lösliche Proteinextrakt verwendet.

4.1.3 LOX Aktivitätstest

Der Aktivitätstest wurde nach dem Protokoll von Trackman *et al.* (1981) durchgeführt (vgl. Kapitel 3.12). Das Reaktionsschema ist Abb. 12 zu entnehmen.

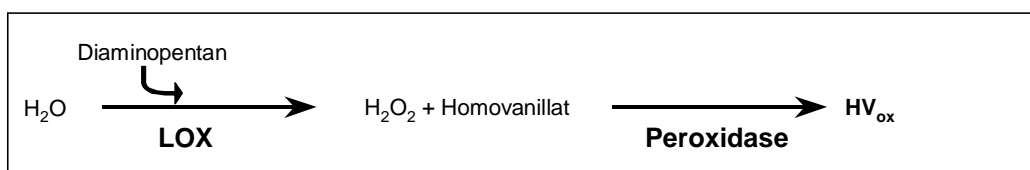


Abb. 12: Reaktionsschema des gekoppelten LOX-Aktivitätstests. LOX katalysiert die Oxidation des Substrates Diaminopentanon, wobei H_2O_2 entsteht. In der nachfolgenden Peroxidase-Reaktion wird Homovanillat unter Reduktion von H_2O_2 zu einer fluorimetrisch nachweisbaren Substanz (HV_{ox}) oxidiert.

Um die kleinste detektierbare H_2O_2 -Menge zu bestimmen, die im gekoppelten LOX-Test gebildet werden muß, damit in der Folgereaktion nachweisbare Mengen oxidiertes Homovanillat gebildet werden können, wurde zunächst ein Vortest durchgeführt. Dabei wurden steigende H_2O_2 -Konzentrationen (0,075 μM - 75 mM) mit Homovanillat und 40 μg

Peroxidase inkubiert und die Entstehung des oxidierten Produkts (HV_{ox}) fluorimetrisch verfolgt.

Die geringste noch detektierbare Menge oxidierten Homovanillats wurde bei Einsatz von $7,5 \mu M$ H_2O_2 gebildet. Geringere Konzentrationen H_2O_2 reichten zur Detektion von HV_{ox} nicht mehr aus. Einen maximalen Anstieg der RFU (relative Fluoreszenzeinheiten) konnte bei einer H_2O_2 -Konzentration von $0,75 \text{ mM}$ detektiert werden. H_2O_2 -Konzentrationen über $0,75 \text{ mM}$ führten zur Inhibierung der Reaktion (Abb. 13).

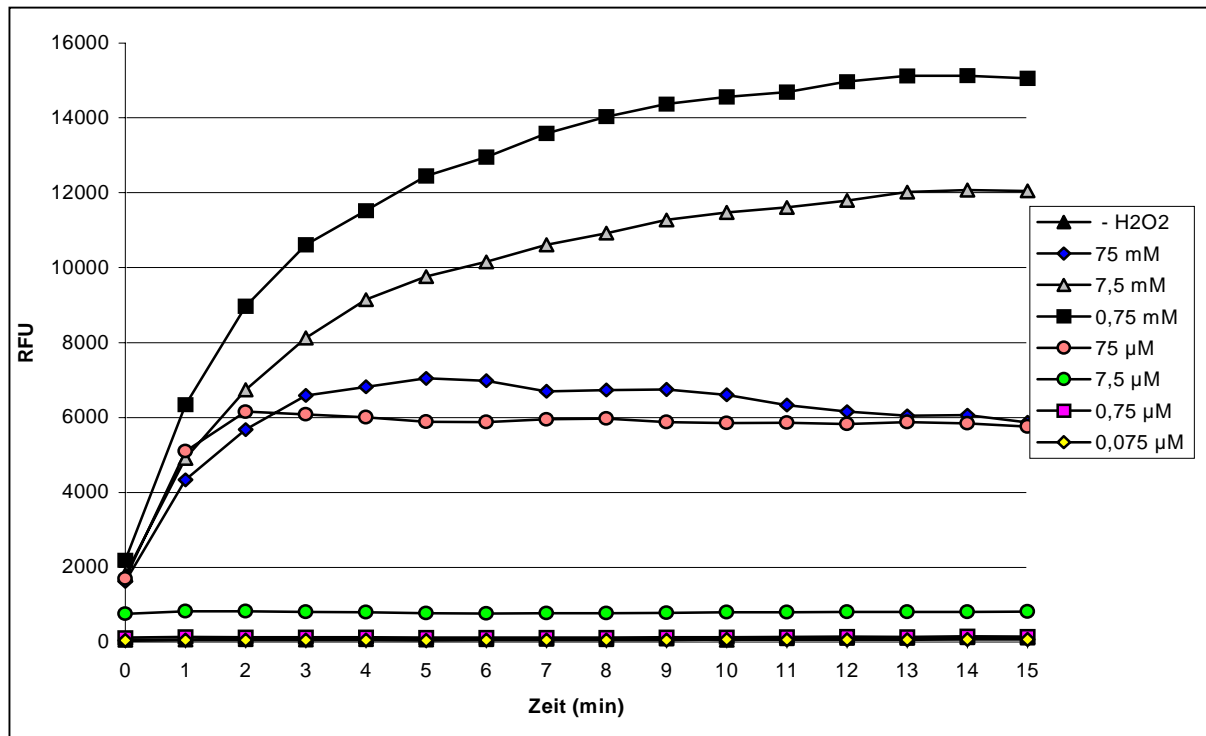


Abb. 13: Bestimmung der Peroxidase-Aktivität nach Inkubation mit steigenden H_2O_2 -Mengen. Die Konzentration des Substrates Homovanillat wurde konstant gehalten. Der Nachweis erfolgte durch Bildung von HV_{ox} , das zum Anstieg der relativen Fluoreszenz-Einheiten (RFU) führte.

Im anschließend durchgeführten gekoppelten LOX-Test wurden 20-50 μl BL21-Extrakt (mit im Western-Blot nachweisbaren LOX-Mengen) eingesetzt. Nach Start der Reaktion mit Diaminopentan wurde die Entwicklung der RFU über 30 min im Spektrofluorimeter (SpectraMax Gemini XS, Molecular Devices) beobachtet. Da dieses Gerät lediglich eine konstante Temperatur von $42^\circ C$ halten kann, das Temperaturoptimum der gekoppelten Reaktion unter diesen Bedingungen aber bei $50-52^\circ C$ liegt, wurden zusätzlich Ansätze nach Reaktionsstart für 5 min bei $50^\circ C$ inkubiert. In diesem Fall wurden die RFU vor und nach der Inkubation aufgezeichnet. Als Negativkontrollen wurden nicht transformierte BL21-Zellen verwendet, die unter identischen Bedingungen wie die Expressionskulturen angezogen worden waren. Eine Positivkontrolle stand nicht zur Verfügung.

Die Analyse von acht unabhängigen Klonen zeigte, daß in keiner Probe LOX-Aktivität, d.h. eine Zunahme der RFU nachzuweisen war, obwohl im Western-Blot bereits gezeigt worden

war, daß in den entsprechenden Extrakten LOX vorhanden war. Auch die Inkubation der Reaktionsansätze bei 50°C bewirkte keine Fluoreszenz-Entwicklung, die über dem Kontrollwert lag.

4.1.4 Stabile Transformation von Kartoffelpflanzen mit *sLOX*

Ziel der Arbeit war die Expression reifer, aktiver LOX in Kartoffelpflanzen. Um verschiedene Expressionsorte zu testen, wurden Konstrukte hergestellt, die eine Lokalisation der LOX in Plastiden bzw. im Apoplasten gewährleisten sollten. Hierfür wurden im 5'-Bereich der synthetischen Sequenz entsprechende Signalpeptide fusioniert. Die Expression beider Varianten erfolgte unter Kontrolle des 35S-Promotors aus Blumenkohlmosaikvirus (Odell *et al.*, 1985). Da für LOX kein spezifischer Antikörper zur Verfügung stand wurde an das 3'-Ende des Gens zusätzlich der c-myc Tag fusioniert (Evan *et al.*, 1985). Je Konstrukt wurden 50 unabhängige Linien regeneriert. Die Expressionskassetten waren folgendermaßen aufgebaut:

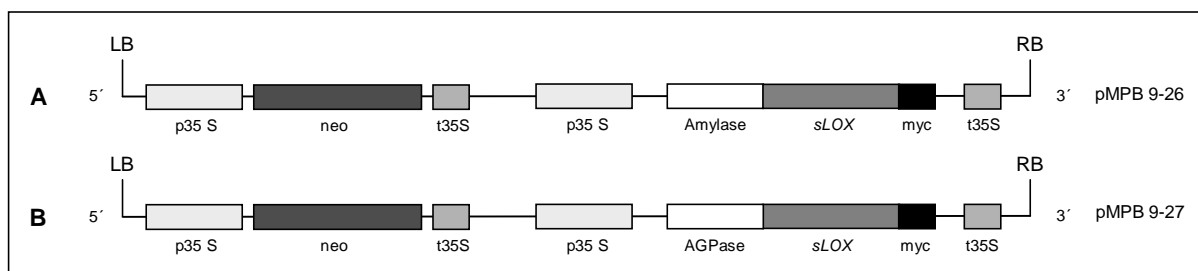


Abb. 14: Aufbau der T-DNA zur Expression von LOX in Pflanzen. (A) *sLOX* mit α -Amylase Signalpeptid zur Sekretion in den Apoplasten, (B) *sLOX* mit AGPase-Signalpeptid für plastidäre Lokalisation, (LB) linke T-DNA Grenze, (RB) rechte T-DNA Grenze, (p35S) 35S-Promotor, (neo) Neomycin-Phosphotransferase II, (t35S) 35S-Terminator, (Amylase) α -Amylase Signalsequenz aus Gerste, (AGPase) cDNA des Signalpeptids der AGPase aus Raps, (*sLOX*) synthetische LOX-DNA, (myc) c-myc Tag.

4.1.5 Analyse der transgenen LOX-Pflanzen

4.1.5.1 Northern-Blot Analyse

In den verschiedenen Transformanten wurden die Transkriptmengen des Fremdgens untersucht. Pro Konstrukt wurden dabei 50 unabhängige Linien im Northern-Blot getestet. Die zu erwartenden Längen der vollständigen Transkripte (ohne poly-A Schwanz) betrugen in den Pflanzen mit apoplastischem Konstrukt (pMPB 9-26) ca. 860 bp und mit plastidärem Konstrukt (pMPB 9-27) ca. 1 kb. In den pMPB 9-27-Transformanten zeigten 29 von 50 analysierten Pflanzen ein Signal bei einer Größe von ca. 1,2 kb. In den 50 pMPB 9-26-Linien konnte in 32 Individuen Transkript von etwa 1 kb identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Als Negativkontrolle diente RNA aus einer untransformierten Wildtyp-Kartoffelpflanze sowie

einer transgenen TEL-Linie (Kapitel 4.2.4.1), um unspezifische Signale durch die übertragene T-DNA auszuschließen. In beiden Kontrollen wurde weder ein Signal noch Hintergrundmarkierung detektiert. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurde abschließend ein Northern-Blot mit acht Linien, die in unterschiedlichen Versuchen analysiert worden waren, durchgeführt. Die Ergebnisse waren vollständig reproduzierbar.

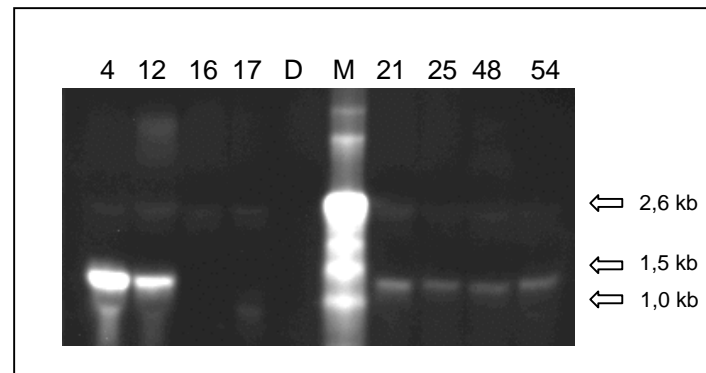


Abb. 15: Northern-Blot von Gesamt-RNA aus pMPB 9-27 Pflanzen. Aufgetragen sind verschiedene LOX-Linien (Bezeichnung mit Zahlen). **(D)** Wildtyp Kontrolle, **(M)** Molekularmassenstandard. Pro Spur wurden jeweils 20 µg Gesamt-RNA geladen. Die Detektion erfolgte mit CDP-Star (Roche) im Fluor-S MAX Multiimager (Biorad).

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Northern-Blot Analyse der LOX-Pflanzen zusammengefaßt:

Tab. 10: Zusammenfassung der Northern-Blot Analyse der LOX-Pflanzen. Die Signalstärken wurden in fünf Kategorien unterteilt.

Signalstärke	++++	+++	++	+	-	positiv
pMPB 9-26 (sekretiert)	2	5	6	19	18	64%
pMPB 9-27 (plastidär)	2	1	2	24	21	58%

Von jeder Transformation wurden 16 Linien mit nachweisbaren Transkriptmengen ins Gewächshaus ausgebracht und dort zur Produktion von Blattmaterial und Miniknollen angezogen. Dabei wurden sowohl Linien mit hohen und niedrigen mRNA-Gehalten berücksichtigt.

4.1.5.2 Western-Blot Analyse der LOX-Linien

4.1.5.2.1 Testen des LOX-Antiserums

Um die Verwendbarkeit des spezifischen LOX-Antiserums (freundlicherweise von K. Csiszar, University of Hawaii, Hawaii, zur Verfügung gestellt) für die Detektion in Pflanzenextrakten zu testen, wurden in *Pichia pastoris* exprimierte LOX mit C-terminalem c-myc-Epitop verwendet. Das rekombinante Protein aus Hefe wurde in verschiedenen Konzentrationen mit

Pflanzenextrakt vermischt und eine Western-Blot Analyse der Proben angeschlossen (Abb. 16).

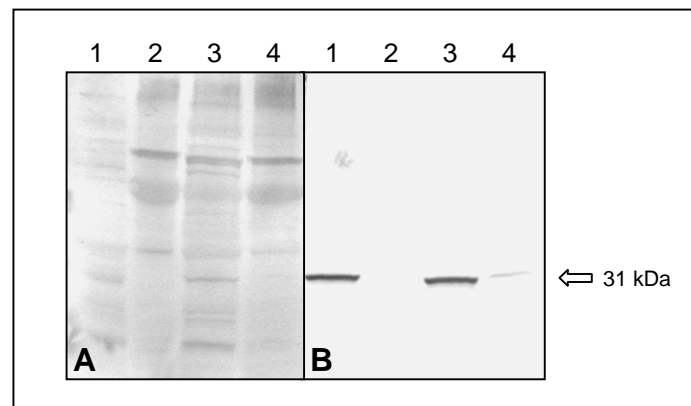


Abb. 16: Nachweis von rekombinanter LOX im Western-Blot mit unterschiedlichen Antikörpern. **(A)** Detektion mit LOX-Antiserum, **(B)** Detektion mit c-myc Antikörper. **(1)** 10 µl induzierter *Pichia*-Extrakt KM71H:pMPB 9-19, **(2)** Kartoffel-Blattextrakt, Wildtyp, 20 µg, **(3)** 20 µg Kartoffel-Blattextrakt + *Pichia*-Extrakt (20 µl), **(4)** 20 µg Kartoffel-Blattextrakt + *Pichia*-Extrakt (2 µl).

Wie der Blot zeigt, wird rekombinante LOX aus *Pichia pastoris* durch das LOX-Antiserum schlecht erkannt. Im Pflanzenextrakt und im Hefeextrakt wurden Hintergrundbanden markiert, welche die LOX-spezifische Bande überdecken. Die Entwicklung mit dem c-myc Antikörper zeigte hingegen deutliche Signale bei ca. 31 kDa, was der erwarteten Größe entspricht. Sowohl im Hefe- als auch im Pflanzenextrakt konnte LOX ohne Entwicklung von unspezifischen Banden detektiert werden. Das LOX-Antiserum wurde daher nicht für die Pflanzenanalysen verwendet.

4.1.5.2.2 Nachweis von LOX in transgenen Pflanzen

Nachdem in einem Großteil der untersuchten Linien spezifisches sLOX-Transkript nachgewiesen werden konnte, wurden die regenerierten Pflanzenlinien durch Western-Blot Analyse auf LOX-Expression überprüft. Dafür wurden Gesamtproteinextrakte aus Gewebekultur-Blattgewebe hergestellt. Pro Konstrukt wurden 50 Pflanzen (1 Pflanze/Linie) analysiert. Die Detektion erfolgte mit dem c-myc Antikörper.

In keiner einzigen Pflanze, die mit pMPB 9-26 (LOX im Apoplasten) und pMPB 9-27 (LOX im Plastiden) transformiert worden war, konnte rekombinantes Protein nachgewiesen werden.

Um Gewebekultur-Effekte auszuschließen, wurde zusätzlich vier Wochen altes Blattmaterial von den 16 Gewächshaus-Linien mit detektierbaren Transkriptmengen geerntet und im Western-Blot analysiert. Auch hier konnte in keiner Linie Protein nachgewiesen werden.

4.1.5.2.3 Analyse von transgenem Knollenmaterial

Da die Kartoffelknollen das eigentliche Zielgewebe zur Produktion der Fremdproteine waren, wurden die im Gewächshaus angezogenen Miniknollen auf LOX-Gehalt getestet. Dafür wurden Proteinextrakte aus Knollen hergestellt und im Western-Blot analysiert. Nach Entwicklung mit dem c-myc Antikörper konnte auch in diesem Gewebe in keiner Linie LOX nachgewiesen werden.

4.1.6 Transiente Tests in Tabak-Protoplasten

Da in allen transgenen Linien der mit pMPB 9-26 und pMPB 9-27 transformierten Kartoffelpflanzen keine LOX in Blatt- und Knollengewebe nachzuweisen war, sollte anhand von transienten Tests überprüft werden, inwieweit die verwendeten Konstrukte prinzipiell in Pflanzenzellen funktionell sind. Als Testsystem wurden sowohl Protoplasten aus BY2-Suspensionskulturen als auch Mesophyll-Protoplasten aus Tabakblättern verwendet. Für einen direkten Nachweis der Genprodukte wurden Fusionsproteine mit GFP hergestellt. Auch wenn ein direkter immunologischer Nachweis aufgrund geringer Proteinkonzentrationen nicht möglich ist, kann auf diese Weise die erfolgreiche Proteinsynthese durch die zu beobachtende Grünfluoreszenz sichtbar gemacht werden.

4.1.6.1 Herstellung der Konstrukte

Für die transienten Tests wurden verschiedene Fusionen von LOX mit GFP hergestellt (Abb. 17). Um die Funktionalität des GFP zu erhalten, wurde für die Konstrukte lediglich das N-terminale Methionin deletiert, um einen möglichen internen Translationsstart auszuschließen (Karlsson & Pines, 1998). Zunächst wurden die Konstrukte pMPB 9-43 und pMPB 9-50 angefertigt. Im Vektor pMPB 9-43 wurde die *gfp*-Sequenz an den 3'-Terminus der *sLOX*-Sequenz, bei pMPB 9-50 an den 5'-Terminus fusioniert. Außerdem wurden mit dem Vektor pMPB 9-46 eine Expressionskassette kloniert, welche die humane DNA-Sequenz des Propeptids mit der humanen *LOX*-DNA (reifer Teil) fusioniert.

Als Kontrollen wurden verschiedene *gfp*-Konstrukte verwendet. Für cytosolisch lokalisiertes GFP stand bereits der Vektor pCATgfp zur Verfügung. Zusätzlich wurde GFP noch mit Signalpeptiden fusioniert, die bereits für die *sLOX*-Konstrukte pMPB 9-26 und 9-27 verwendet worden waren. Die Fusion mit dem α -Amylase Signalpeptid (pMPB 9-40) sollte zu einer Sekretion des GFP ins Medium führen, die Fusion mit dem AGPase Signalpeptid zu einem Import in die Plastiden der Protoplasten.

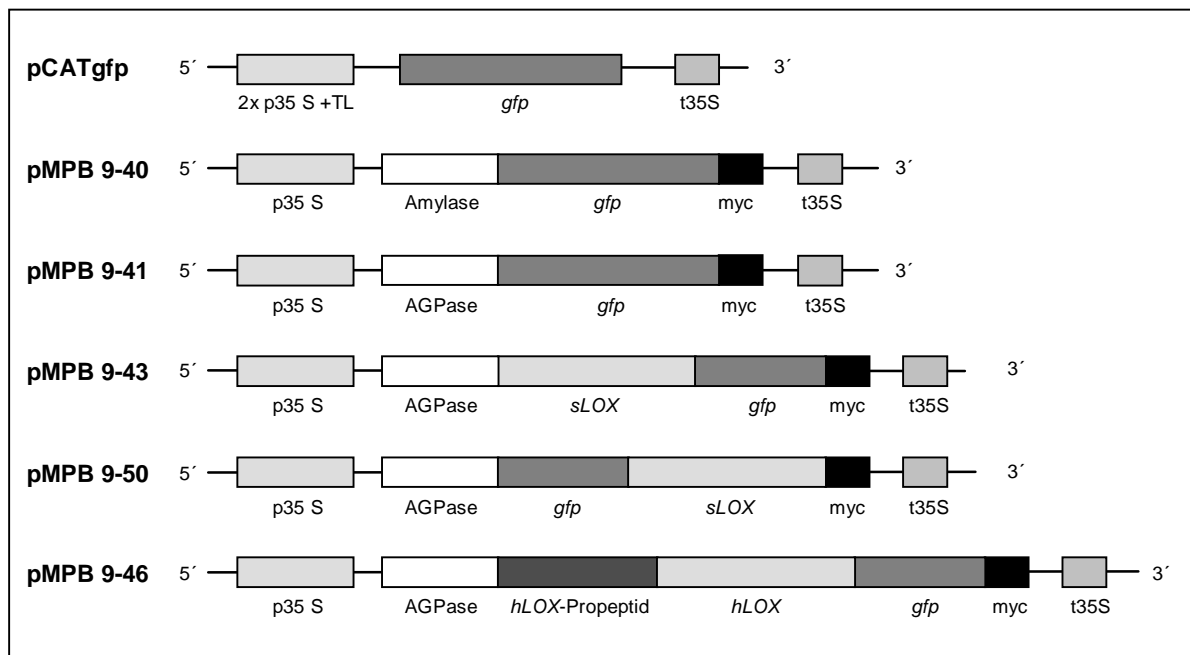


Abb. 17: Schematische Darstellung der Expressionskassetten zur transienten Expression von GFP und LOX-GFP-Fusionsproteinen in isolierten Protoplasten. (**p35S**) 35S-Promotor, (**2xp35S+TL**) 2x 35S-Promotor mit Translations-Verstärker, (**Amylase**) cDNA des Signalpeptids der α -Amylase aus Gerste, (**AGPase**) cDNA des Signalpeptids der AGPase aus Raps, (**gfp**) cDNA des grün fluoreszierenden Proteins aus *Aequorea victoria*; (**hLOX-Propeptid**) humane cDNA-Sequenz des LOX-Propeptids, (**sLOX**) synthetische LOX DNA, (**hLOX**) humane LOX cDNA, (**myc**) c-myc Tag, (**t35S**) 35S-Terminator.

4.1.6.2 Optimierung der Versuchsbedingungen mit den Kontrollplasmiden

Zu Beginn der Versuche wurden zunächst Test-Transformationen von BY2-Protoplasten mit den Kontrollplasmiden pCATgfp und pMPB 9-41 durchgeführt und die Grünfluoreszenz mikroskopisch beobachtet (Abb. 18). Cytosolisch lokalisiertes GFP war in BY2-Protoplasten als diffuse Grünfärbung des gesamten Cytoplasmas nachweisbar, wobei in der Mitte der Zelle ein besonders stark fluoreszierender Bereich auffiel, der in der Durchlichtaufnahme als dichte Struktur erkennbar ist. Hierbei handelt es sich um den Zellkern in dessen Bereich sich das Cytoplasma mit den Plastiden anreichert. Nach Transformation von GFP mit plastidärem Signalpeptid fluoreszierten hauptsächlich die Plastiden, die als diskrete punkt- bis stäbchenförmige Strukturen im Cytoplasma erkennbar waren. Auch bei diesen Zellen konnte zusätzlich im zentralen Zellbereich eine starke Grünfluoreszenz beobachtet werden. Es ist bekannt, daß GFP aufgrund seiner geringen Größe die Kernporen passieren kann und der Zellkern auf diese Weise ebenfalls fluoresziert (Grebek et al., 1997).

Mit den Versuchen konnte gezeigt werden, daß sich unter den gewählten Versuchsbedingungen sowohl cytosolisch als auch plastidär lokalisiertes GFP in BY2-Protoplasten transient exprimieren läßt.

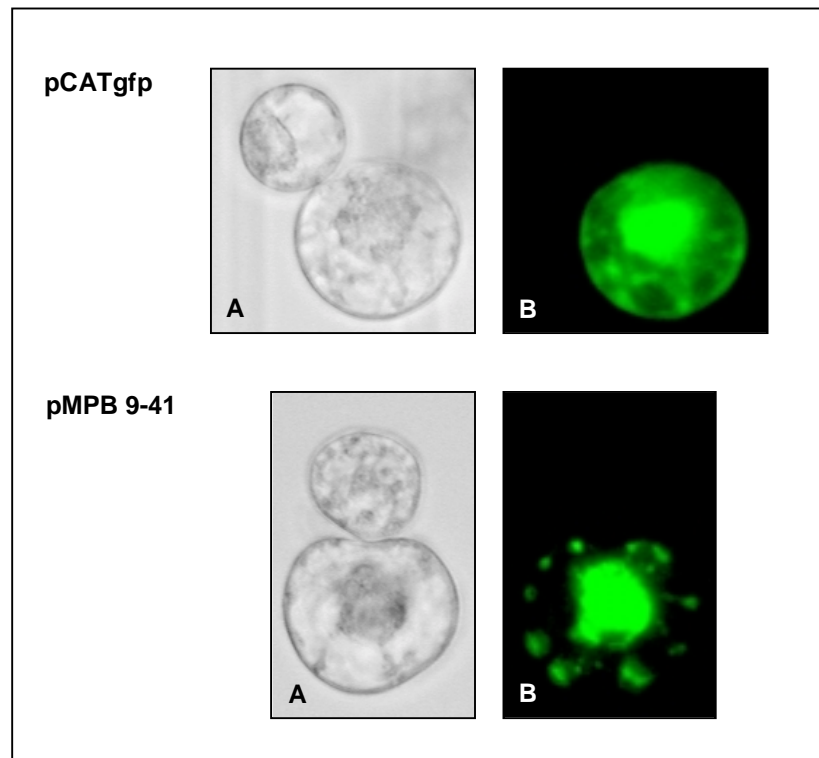


Abb. 18: Mikroskopische Aufnahmen von BY2-Protoplasten nach Kontroll-Transformation mit pCATgfp bzw. mit pMPB 9-41. Der in den jeweiligen Aufnahmen oben gelegene Protoplast ist nicht transformiert und stellt somit die Negativkontrolle dar. (A) Durchlichtaufnahme, (B) GFP-Fluoreszenz nach Anregung mit UV-Licht.

Die Plasmide pCATgfp und pMPB 9-41 wurden zusätzlich in Mesophyll-Protoplasten transformiert (Abb. 19). Die Verteilung der Grünfluoreszenz entsprach der in BY2-Protoplasten, wobei nicht transformierte Protoplasten zusätzlich die charakteristische durch das Chlorophyll verursachte Rotfluoreszenz zeigten. Nach Expression von GFP in den Chloroplasten wurde (je nach Expressionshöhe) dementsprechend eine orange bis grüne Färbung der Chloroplasten beobachtet.

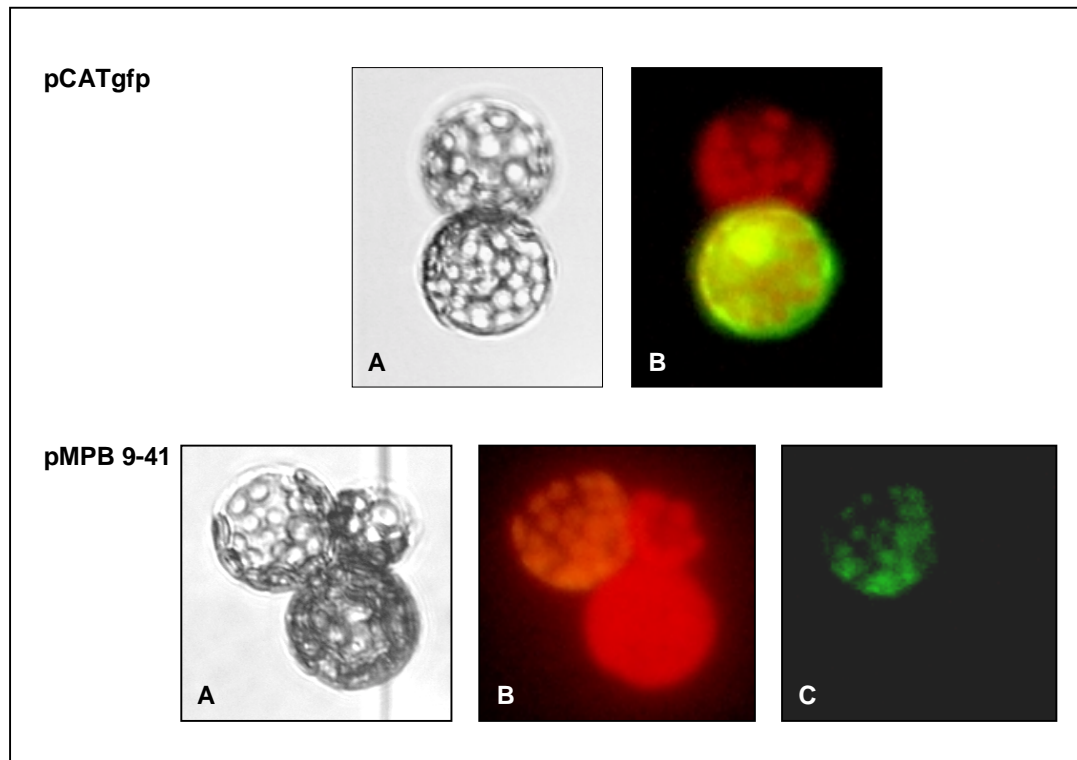


Abb. 19: Mikroskopische Aufnahmen von transformierten Mesophyll-Protoplasten. Die Protoplasten der oberen Reihe wurden mit dem Plasmid pCATgfp, die Protoplasten der unteren Reihe mit pMPB 9-41 (plastidäre Lokalisation) transformiert. (A) Durchlichtaufnahme, (B) GFP-Fluoreszenz mit Filter 09, (C) GFP-Fluoreszenz unter Verwendung des GFP-Rotfilters F41-017.

Um zu überprüfen, zu welchem Zeitpunkt die höchste Anreicherung von GFP nachweisbar ist, wurden die Protoplasten 1 und 2 Tage nach Transformation im Mikroskop auf GFP-Fluoreszenz untersucht. Es zeigte sich, daß die Fluoreszenz von cytosolisch lokalisiertem GFP sowohl am ersten als auch am zweiten Tag gleichbleibend stark war. Im Gegensatz dazu war das GFP nach Import in die Plastiden am zweiten Tag kaum noch nachweisbar. In folgenden Versuchen wurden die Protoplasten deshalb immer nach 24 h analysiert.

Abschließend sollte durch Transformation des Plasmids pMPB 9-40 (mit α -Amylase-Signalpeptid) überprüft werden, ob sekretiertes GFP im Medium nachweisbar ist. Hierfür wurde das Medium transformierter Protoplasten nach einem Tag geerntet und durch Ultrafiltration 80-fach aufkonzentriert. In diesen Proben konnte weder mikroskopisch noch im Western-Blot GFP nachgewiesen werden. Von di Sansebastiano *et al.* (1998) wird ebenfalls beschrieben, daß sekretiertes GFP im Medium nicht detektiert werden konnte.

4.1.6.3 Fluoreszenzuntersuchungen nach transienter Expression von LOX-GFP Fusionsproteinen

Die transiente Expression der Vektoren LOX:GFP, GFP:LOX und Pro:hLOX:GFP in BY2-Tabakprotoplasten zeigte, daß nur nach Transformation von LOX mit vorgeschaltetem Propeptid (Pro:hLOX:GFP) eine Grünfluoreszenz in den Plastiden der Protoplasten zu

beobachten ist. Die Grünfärbung der Protoplasten war allerdings sehr schwach und deutlich niedriger als in der plastidären GFP-Kontrolle und dem Fusionsprotein TEL:GFP. Nach Expression von Pro:hLOX:GFP in Mesophyll-Protoplasten konnte keine Grünfluoreszenz beobachtet werden, da wahrscheinlich durch die Rotfluoreszenz der Chloroplasten das Signal vollständig überdeckt wurde.

LOX mit C- oder N-terminalem GFP führte zu keiner sichtbaren Grünfluoreszenz, so daß davon ausgegangen werden muß, daß die Expression von LOX ohne Propeptid in Pflanzenzellen nicht möglich ist. Das N-terminal fusionierte GFP konnte die Funktion des Propeptids nicht maskieren.

4.1.6.4 Western-Blot Analyse und Detektion im Sandwich-ELISA

Die Protoplasten wurden 1 Tag nach der Transformation geerntet und die Proteinextrakte der mit pMPB 9-41 und pMPB 9-46 transformierten BY2-Protoplasten immunologisch untersucht. Durch Western-Blot Analyse konnte Pro:hLOX:GFP nicht nachgewiesen werden, wohingegen die GFP-Kontrolle deutlich detektiert werden konnte. Alternativ wurde versucht, das Fusionsprotein im Sandwich-ELISA nachzuweisen. Die Mikrotiter-Platten wurde mit spezifischem GFP-Antiserum (Invitrogen) abgesättigt und 100-150 µg Protoplasten-Extrakt eingesetzt. Nach Entwicklung der Platten mit dem c-myc Antikörper konnte die GFP-Kontrolle und Pro:hLOX:GFP eindeutig nachgewiesen werden. Die Signalstärke war jedoch deutlich schwächer als die des GFP, so daß diese Ergebnisse mit den mikroskopischen Untersuchungen korrelieren.

Tab. 11: Ergebnisse des Sandwich-ELISA nach transienter Expression verschiedener *gfp*-Konstrukte in BY2-Protoplasten. Gemessen wurden die OD₄₀₅-Werte 45 min nach Start der AP-Farbreaktion. Angegeben sind zwei unabhängige Versuche (V1, V2) mit jeweils dem Mittelwert von 3 Parallelansätzen. Die Einzelwerte wichen maximal 5% vom Mittelwert ab.

Transformiertes Plasmid	V1	V2
Negativkontrolle	0,122	0,115
pMPB 9-41 (plastidäres GFP)	1,975	2,071
pMPB 9-46 (plastidäres Pro:hLOX:GFP)	0,160	0,411

4.2 Tropoelastin (TEL)

4.2.1 Herstellung des synthetischen *TEL*-Gens (*sTEL*) mit angepaßter „Codon Usage“

4.2.1.1 Design der synthetischen Sequenz

Für die Expression von Tropoelastin im heterologen System wurde die humane cDNA-Sequenz der in Fazio *et al.* (1988) beschriebenen Spleiß-Variante des *eln*-Gens verwendet (2190 bp). Für die Anpassung der „Codon Usage“ wurde die reife Proteinsequenz ohne Signalpeptid verwendet. Die Anpassung erfolgte prinzipiell wie bereits für die *sLOX*-Sequenz beschrieben (Kapitel 4.1.1). Da im TEL-Molekül repetitive Aminosäure-Bereiche vorkommen, wurde durch die Anpassung der „Codon Usage“ der Anteil sich wiederholender Sequenzen stark erhöht. Die Anzahl direkter Sequenzwiederholungen über 12 bp Länge vergrößerte sich von 41 auf über 200 und die Zahl von invertierten Sequenzwiederholungen von 13 auf 22. Die betreffenden Abschnitte wurden durch Einfügen weniger häufig verwendeter Kodons eliminiert.

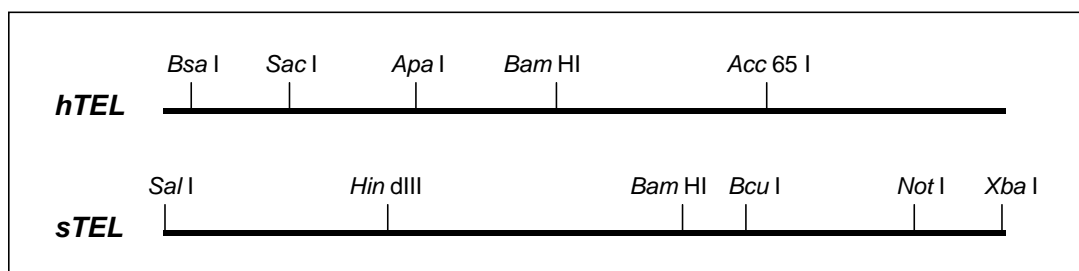


Abb. 20: Schematischer Vergleich der Lage von Restriktionsschnittstellen auf den Sequenzen der humanen und synthetischen *TEL*-DNA. Die in der humanen Sequenz dargestellten Erkennungssequenzen wurden eliminiert und neue in die synthetische DNA eingefügt.

Durch das Anpassen der „Codon Usage“ konnte der G/C-Anteil in der Sequenz von 63,7% auf 56,5% gesenkt werden. Letztendlich wird der G/C-Gehalt durch die Aminosäurekomposition des resultierenden Proteins bestimmt, da in den meisten Fällen lediglich die dritte degenerierte Base eines Triplets variiert wird und so Base 1 und 2 den G/C-Gehalt zu 67% bestimmen. Aus diesem Grund konnte der G/C-Gehalt im *sTEL*-Gen nicht weiter erniedrigt werden, da 77% des Proteins aus Aminosäuren besteht, die durch die Triplets GGX, GCX oder CCX kodiert werden. Allein durch das gehäufte Vorkommen dieser Triplets bestehen 51% der Basen aus Guanin und Cytosin.

Die resultierende DNA-Sequenz stimmt zu 75% mit der humanen Sequenz überein.

sTEL	00A00T0TCC	CA00A0CCAT	TCCA00T00T	0TTC0A00A0	0A0T0TTTTA	CCCT00T0CT	00TCTT00A0	70
hTEL	0	T	G	T	A	T	C	70
sTEL	CACCTT00T00	T00A0CTCT	00TCC0A0A0	0A0A0CCACT	TA0CC0A0TT	CCCT00T00A0	TTCC00A0A0	140
hTEL	C	A	A	G	C	A	G	140
sTEL	G0CTT0T0GA	GC00A0CTT0	GT0CTTTTCC	AGCT0TCTAC	TTTCC0A0A0	CCCTT0T0CC	AG0A0T0TGT	210
hTEL	T	C	C	C	C	T	T	210
sTEL	CC0A0T00CT0	CA0CT00TTA	CA000CT0CA	AA00CA00A0	CT00A0T000	T00C0T00CT	00A0T00T0	280
hTEL	T	C	T	A	G	T	A	280
sTEL	0ACTT00A0T	0TCT0CC00T	0CA0T0T0TC	CACA0CC0A0	A0C0A0A0T0	AA0CC0A0A0	AC0T0CT000	350
hTEL	C	T	A	T	C	T	A	350
sTEL	AGT00A0CTT	CCT00T0TGT	ACCC0A0A00	G0T0CTT0CT	00T0CTAGAT	T0CT00T0T0	T00A0T0CTT	420
hTEL	T	G	T	C	A	C	G	420
sTEL	CC00T0T0TC	CA0CT00A0C	AG0A0TTA00	CCAA0A0A0C	CT00A0T000	T00T0CTTTT	GCT00TATTC	490
hTEL	A	C	C	G	T	A	A	490
sTEL	CAG0A0T0T0	TCCA0TTT0A	00ACC0A0A0	CT00T0T0TC	ACT00A0TAC	CCAT0CA000	CTCC0A0A0CT	560
hTEL	A	C	G	A	C	T	C	560
sTEL	TCC0T0A00T	TAC00A0CTC	CATACACTAC	T00A0A0CTC	CCATAC00TT	AC00A0CC00	AG0T0T0CCA	630
hTEL	G	T	C	A	G	T	A	630
sTEL	GG0A0CC0CT0	GA0AG0CT00	TTAC0CTACT	GA0A0T0GA	TT00A0CC0A	AG0CC0CC0A	GCT0CC0CT0	700
hTEL	T	A	G	A	C	C	A	700
sTEL	CTAA00C0A0	A0CA0A0TTT	00T0CT00A0	C0CT00A0T	TTTAC0T00T	0T000A00A0	CC00T0TACC	770
hTEL	C	C	C	C	T	T	T	770
sTEL	A00C0T0CCT	00A0CTATTC	CAD0A0TT00	AG0A0T0CA	00A0T000A0	CC0A0CT0C	T0CC0CT0CC	840
hTEL	T	G	T	C	C	T	A	840
sTEL	GC0A0A0CC0	CTGCTA00CC	AGCC0A0ATC	GG0A0CT0CT0	CT00TCTTGT	T0CT00G00A	CC00T0TTT0	910
hTEL	A	C	T	A	A	G	A	910
sTEL	GAC0A0A0A0	T0T000T0TG	CC0A0A0CC0	G0T0TCC0A0	T0T000A0TT	CC00T00A0	GATCC0CA0T	980
hTEL	C	G	T	C	T	A	T	980
sTEL	T0T0CCA00A	0CT00TATTC	CT00T0CC0C	T0T0CT00T	0T0T0T0CTC	CA0A00CT0C	T0CC0A0A0CC	1050
hTEL	C	G	A	G	A	A	A	1050
sTEL	CC0C0TA000	CC0CTA00TA	CC0A0CC0A0	CC0T00A0TC0	GA0T00A000	GATCC0A0CT	TAC00A0T00	1120
hTEL	T	A	G	C	A	C	T	1120
sTEL	GAG0A0A0A0	ATTT0CT0GA	TTT0GT0T0T	GAGT00A0A0	TATACCT0GA	GT00CC00A0	TTCC0ATCTGT	1190
hTEL	T	G	C	C	C	A	T	1190
sTEL	T00A00T0TA	CC0A0A0T0	0A00T0T0TC	T00A0T00GA	ATTT0TCC00	AA0CTCA00C	AG0C00CC0A	1260
hTEL	C	T	C	G	T	G	A	1260
sTEL	CC0A0A00CA	CTA00TAC00	T0T000A0CT	CC0A000CT0	CC0A00CTA0	00CA00CT0C	AG0C0A00CTC	1330
hTEL	C	G	A	A	A	A	C	1330
sTEL	AA0TT0GCTCT	TCTTAATCTT	GCT0GACTAG	TTCC0A00CT	AG0A0T00CT	CC0A0T0T0G	GT0T0GCTCC	1400
hTEL	G	C	A	T	T	C	G	1400



Abb. 21: Sequenzvergleich der humanen TEL-cDNA (*hTEL*) mit der synthetischen Sequenz (*sTEL*). Es wurde die von Fazio *et al.* (1988) beschriebene Spleißvariante verwendet.

4.2.1.2 Synthese der angepassten *sTEL*-Sequenz

Da Vorversuche gezeigt hatten, daß die Synthese von Fragmenten über 1000 bp mit der verwendeten Methode problematisch ist, wurde das *sTEL*-Gen in drei Subfragmenten synthetisiert und anschließend über flankierende Restriktionsschnittstellen assembliert (Abb. 22). Als Zielvektor für alle Klonierungen diente pBlueSfi BA (Hausmann & Töpfer, 1999).

Fragment #1 hatte eine Länge von 600 bp und wurde nach Ligation der Plus-Strang Oligonukleotide bei 65°C Hybridisierungs-Temperatur amplifiziert und über die flankierenden *Sa*I und *Hin*dIII Restriktionsschnittstellen subkloniert. Die anschließende Sequenzanalyse zweier unabhängiger Klone zeigte, daß in beiden Klonen jeweils eine Punktmutation vorhanden war. Durch eine interne *Pst*I-Schnittstelle konnten die fehlerfreien Regionen

beider Klone miteinander kombiniert werden, so daß ein korrektes *sTEL*-Fragment #1 resultierte. Eine abschließende Sequenzierung bestätigte die richtige Basenabfolge.

Das zweite Subfragment bestand aus 850 bp und wurde nach Ligation der Oligonukleotide ebenfalls bei einer Hybridisierungs-Temperatur von 65°C amplifiziert. Bei der folgenden Gelelektrophorese zeigte sich, daß bei der erwarteten Größe eine Doppelbande zu erkennen war. Aus diesem Grund wurden beide Banden getrennt eluiert, über *Hin* dIII und *Bcu* I subkloniert und jeweils zwei Klone sequenziert. Die Sequenzanalyse zeigte, daß nur die etwas kleinere Bande dem gewünschten Fragment entsprach. Die beiden sequenzierten Klone #1 und #2 trugen jeweils eine Punktmutationen an unterschiedlichen Stellen, die nicht durch Austausch von Subfragmenten eliminiert werden konnten. Daher wurde durch ortsspezifische Mutagenese mit den Oligonukleotiden STEL-mut1 und STEL-mut1as die Sequenz von Klon #1 korrigiert.

Fragment #3 hatte eine Größe von 800 bp und wurde nach Ligation bei 65°C Hybridisierungs-Temperatur amplifiziert. Das Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *Bcu* I und *Xba* I nachgeschnitten und kloniert. Auch hier waren in zwei unabhängigen Klonen Punktmutationen vorhanden, die nur durch *in vitro* Mutagenese eliminiert werden konnten. Der Austausch erfolgte mit den Oligonukleotiden STEL-mut2 und STEL-mut2as.

Die drei *sTEL*-Fragmente mit korrekter Sequenz wurden anschließend assembliert. Es resultierte der Vektor pMPB 9-28a.

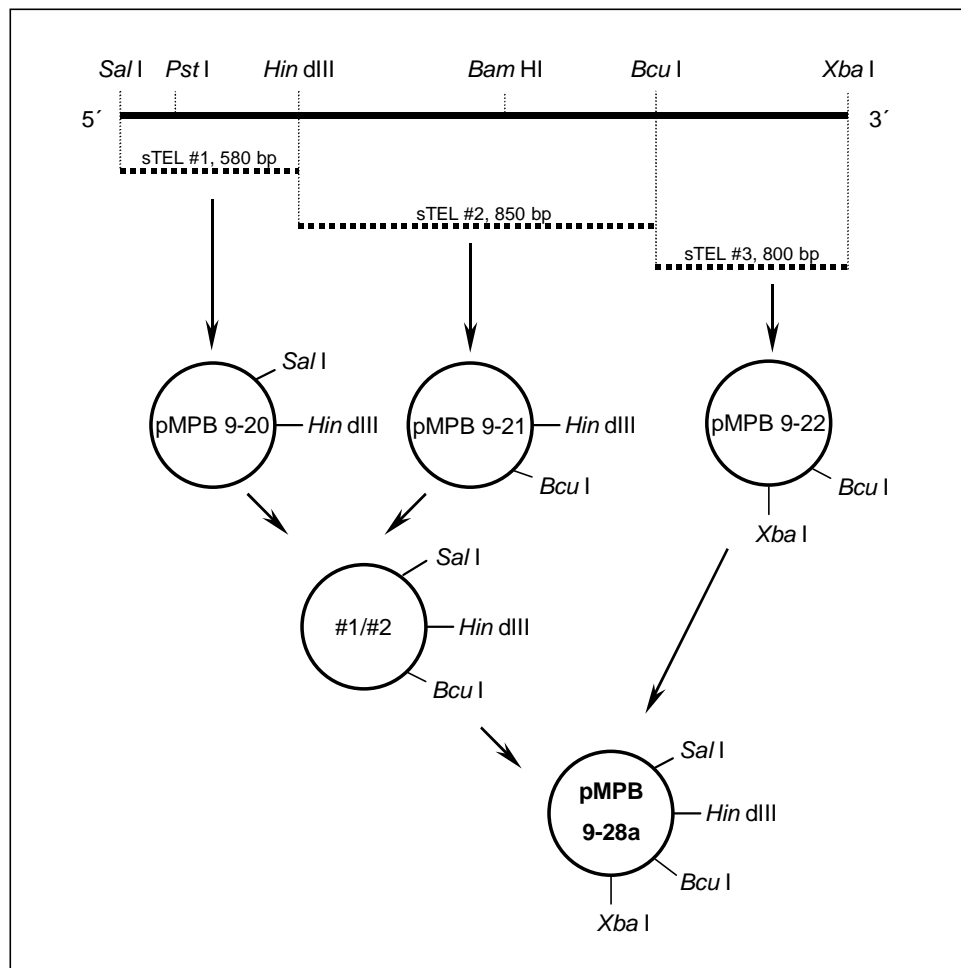


Abb. 22: Klonierungsschema der *sTEL*-Subfragmente und deren Assemblierung zum vollständigen synthetischen Gen. In die synthetische Sequenz wurden sechs Restriktionsschnittstellen eingefügt, die zur Assemblierung der Subfragmente genutzt wurden. Der Vektor pMPB 9-28a enthält das vollständige synthetische Gen.

4.2.2 Etablierung eines Systems zur Herstellung von TEL als Positivkontrolle

Da Tropoelastin nicht im Handel erhältlich ist und kein Kooperationspartner Protein in ausreichenden Mengen zur Verfügung stellen konnte, sollte das Protein im Hefe- oder im bakteriellen System exprimiert werden. Das rekombinant hergestellte Protein sollte als Positivkontrolle und zur Etablierung von Nachweismethoden für die späteren Pflanzenanalysen verwendet werden.

4.2.2.1 Expression von TEL in Hefe

Zur Synthese von TEL in *Pichia pastoris* wurden zwei Konstrukte zur intrazellulären (pMPB 9-33) bzw. extrazellulären (pMPB 9-34) Expression hergestellt (Abb. 23). Die Konstrukte tragen am 3'-Ende der *sTEL*-Sequenz den c-myc und den (His)₆-Tag. Beide

Plasmide wurden in die Stämme X-33 und KM71H transformiert und zunächst der mut-Phänotyp der Transformanten überprüft.

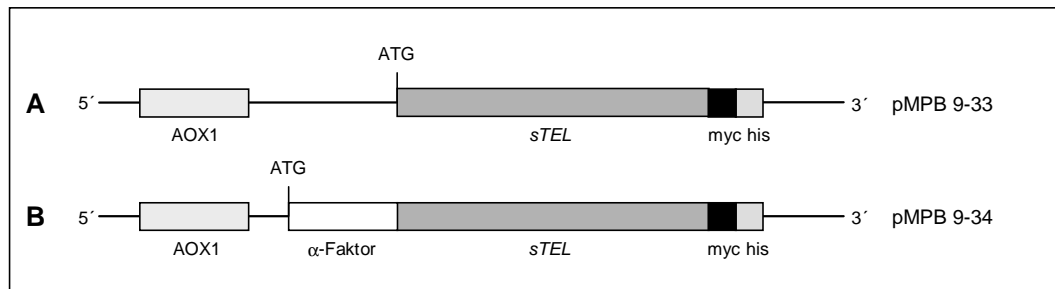


Abb. 23: Konstrukte zur Expression von TEL in *Pichia pastoris*. Beide Konstrukte tragen am 3'-Ende einen c-myc- und einen (His)₆-Tag. **(A)** Kassette zur cytosolischen Expression **(B)** Kassette zur extrazellulären Expression. **(AOX1)** AOX1 Promotor, **(α -Faktor)** α -„Mating“-Faktor aus *Saccharomyces cerevisiae*, **(sTEL)** synthetische TEL-DNA, **(myc)** c-myc Tag, **(his)** (His)₆ Tag.

4.2.2.1.1 Sekretion von TEL ins Medium

Nach der Transformation wurde zunächst der mut-Phänotyp der transformierten Klone überprüft. Jeweils 10 verschiedene mut⁺ X-33 und 10 mut^S KM71H Transformanten wurden induziert und die Fremdgenexpression über 4 bzw. 6 Tage verfolgt. Weder im Überstand noch im Pellet konnte TEL mit dem c-myc Antikörper im Western-Blot detektiert werden.

4.2.2.1.2 Intrazelluläre Expression von TEL

Es wurden jeweils 10 transformierte X-33 (mut⁺) und KM71H (mut^S) Klone induziert und die Fremdgenexpression über einen Zeitraum von 5 Tagen untersucht. Nach Western-Blot Analyse konnte in keinem Klon rekombinantes TEL nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Versuche zur Expression von TEL in Hefezellen eingestellt.

Tab. 12: Zusammenfassung der Ergebnisse zur intra- und extrazellulären Expression von TEL in *Pichia pastoris*.

Konstrukt	X-33 (mut ⁺)		KM71H (mut ^S)	
	Zahl getesteter Klone	Expression	Zahl getesteter Klone	Expression
pMPB 9-33	10	0/10	10	0/10
pMPB 9-34	10	0/10	10	0/10

4.2.2.2 Expression von TEL in *E. coli*

Für die Expression von TEL in *E. coli* wurden verschiedene pASK-IBA-Vektoren verwendet. Es wurden parallel zwei Ansätze verfolgt: Zum einen wurde für die cytosolische Expression das synthetische Gen in den Vektor pASK-IBA5 (= pMPB 9-35) kloniert. Zum anderen wurde sTEL in den Vektor pASK-IBA4 inseriert, der zusätzlich die ompA-Signalsequenz zur Sekretion des rekombinanten Proteins ins Periplasma der Zellen enthält (Abb. 24). Beide rekombinanten Proteine enthalten am N-Terminus den Strep-Tag II.

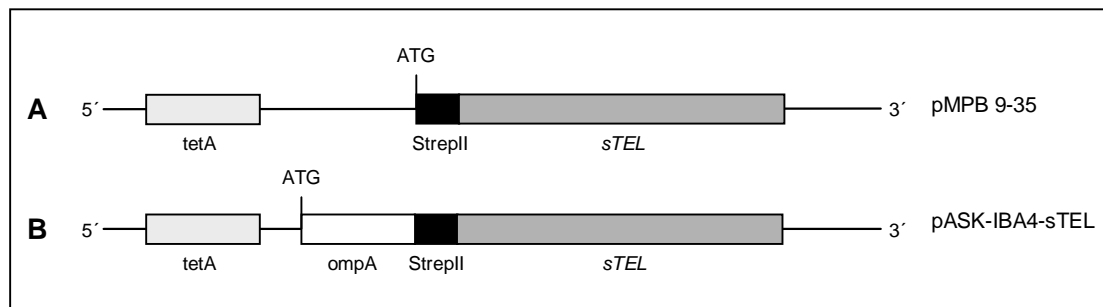


Abb. 24: Aufbau der Expressionskassetten von pMPB 9-35 (**A**) und pASK-IBA4-sTEL (**B**). Die Expression des Fremdgens wird in beiden Konstrukten durch den *tetA*-Promotor reguliert. Das Plasmid pMPB 9-35 führt zur cytosolischen Expression von rekombinantem TEL. In pASK-IBA4-sTEL ist im 5'-Bereich der *sTEL*-DNA zusätzlich die *ompA*-Signalsequenz fusioniert, welche die Sekretion in das Periplasma vermittelt und nach dem Export abgespalten wird. (**tetA**) Tetrazyklin Promotor, (**ompA**) Signalpeptid des *ompA*-Gens aus *E. coli*, (**StrepII**) Strep-Tag II, (**sTEL**) synthetische TEL-DNA, (**ATG**) Startkodon.

4.2.2.2.1 Expression von rekombinantem TEL mit N-terminalem Strep-Tag II in XL1-Blue

Zunächst wurden beide Plasmide in XL1-Blue transformiert und je zwei unabhängige Klone bei 30°C und 37°C induziert. Nach cytosolischer Expression konnte TEL bei beiden Temperaturen in den Zellen nachgewiesen werden. Die Expressionshöhe erreichte 1-2 h nach Induktion das Maximum (Abb. 25).

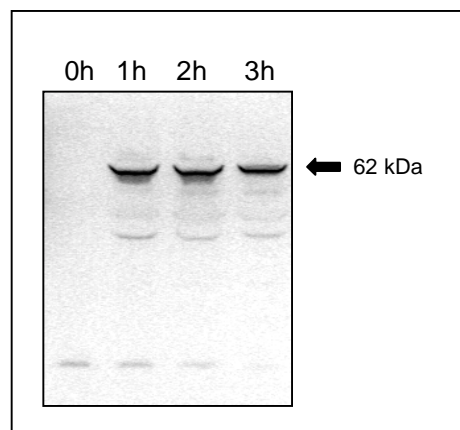


Abb. 25: Western-Blot Analyse nach cytosolischer Expression von TEL in XL1-Blue bei 30°C. Die Expressionskultur wurde bei einer $OD_{550}=0,5$ mit 0,4 µg/ml AHT induziert. Vor Induktion (0 h) und 1 h, 2 h, 3 h nach der Induktion wurden Proben entnommen. Pro Spur wurden gleiche Zellmengen entsprechend einer $OD_{550}=0,3$ aufgetragen.

Im Gegensatz zur erfolgreichen cytosolischen Expression von TEL führte die Induktion des periplasmatischen Konstrukts nicht zu nachweisbaren Mengen rekombinanten Proteins. Zusätzlich zeigten die Wachstumskurven der mit dem periplasmatischen Konstrukt

transformierten Kulturen, daß sich die Zellen nach Induktion nicht weiter teilten (Abb. 26). Alle weiteren Versuche wurden deshalb mit XL1-Blue:pMPB 9-35 durchgeführt.

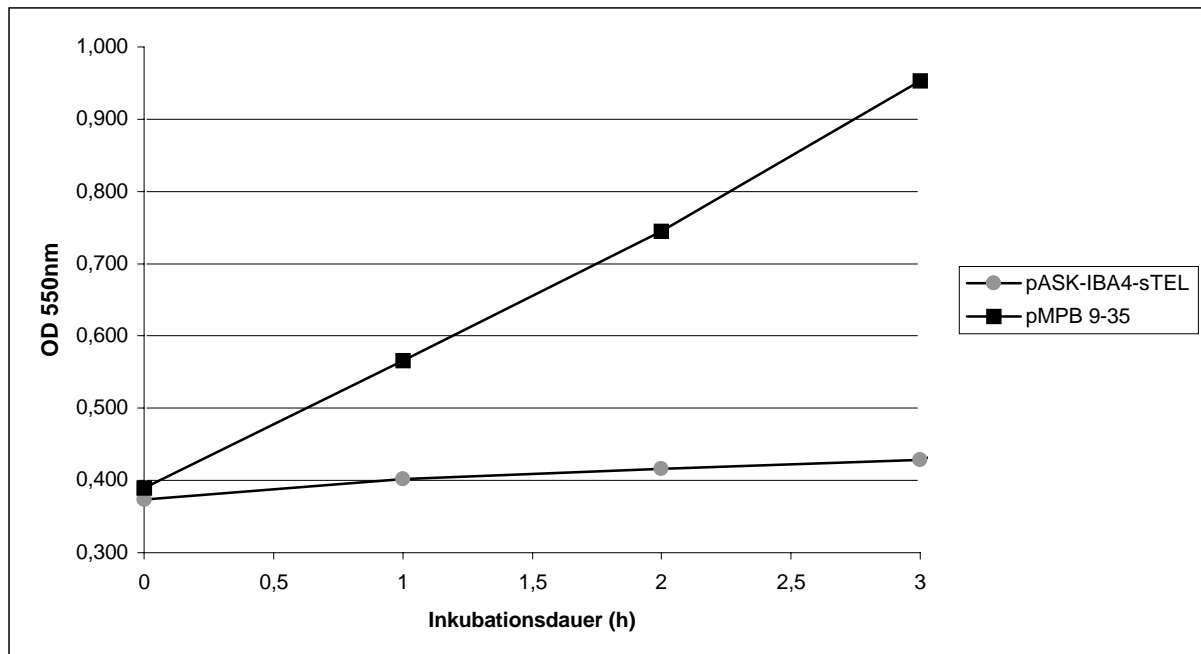


Abb. 26: Wachstumskurven von induzierten XL1-Blue-Expressionskulturen bei 30°C. Die Induktion wurde zum Zeitpunkt des 0 h-Wertes durchgeführt. Die Zunahme der OD wurde bei 550 nm verfolgt. pMPB 9-35 = cytosolisches Konstrukt, pASK-IBA4-sTEL = periplasmatisches Konstrukt.

Zur weiteren Optimierung wurden die Bedingungen ermittelt, bei denen ein möglichst großer Teil des rekombinanten TEL in löslicher Form in den Zellen vorliegt. Dafür wurden die Expressionskulturen bei 30°C bzw. 37°C induziert. Western-Blot Analysen zeigten, daß etwa die Hälfte des synthetisierten TEL bei 37°C in Einschlußkörpern vorlag. Bei 30°C war das gesamte Protein löslich, jedoch mit der bei 37°C produzierten löslichen Menge vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Da das Wachstum der Zellen bei 37°C schneller ist und die lösliche TEL-Menge unter beiden Bedingungen nahezu gleich bleibt, wurden Folgeexperimente bei 37°C durchgeführt.

Ergänzend wurde versucht, durch die Zugabe von Aminosäuren zum Medium die produzierte TEL-Menge zu erhöhen. Es zeigte sich jedoch, daß die Zugabe von 1,5% „Casamino Acids“ zum Medium nicht zu einer Erhöhung der Menge rekombinanter TEL führt.

4.2.2.2.2 Optimierung des Zellaufschlusses

Um zu überprüfen, ob durch Wechselwirkungen mit anderen Proteinen die Extraktion von TEL aus den Zellen erschwert wird, erfolgte der Aufschluß mit verschiedenen Puffern. Als Standardpuffer wurde der vom Vertreiber des Strep-Tag Expressionssystems empfohlene Puffer W (50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) verwendet, dem verschiedene Additive zugesetzt wurden. Weder der Zusatz von NaCl (150 mM) noch Tween-20 (0,25%) führte zu

einer Erhöhung der extrahierbaren TEL-Mengen. Auch durch Zugabe von 8 M Harnstoff konnte die Ausbeute an rekombinantem TEL nicht erhöht werden (Daten nicht gezeigt).

4.2.2.2.3 Degradation

Die Western-Blot Analysen von rekombinantem TEL zeigten, daß in den Zellextrakten nicht nur die dem reifen Protein entsprechende Bande von 62 kDa, sondern noch weitere niedermolekulare Banden von ca. 55, 47, 35, 30 kDa enthalten waren (Abb. 27). Diese Banden wurden sowohl vom Strep-Tactin-AP Konjugat als auch vom spezifischen TEL-Antikörper erkannt, so daß es sich um Degradationsprodukte von TEL handeln muß. Die Zugabe von Protease-Inhibitoren (Pefabloc, Inhibitor Cocktail) zum Aufschlußpuffer beeinflusste dieses charakteristische Bandenmuster aber nicht.

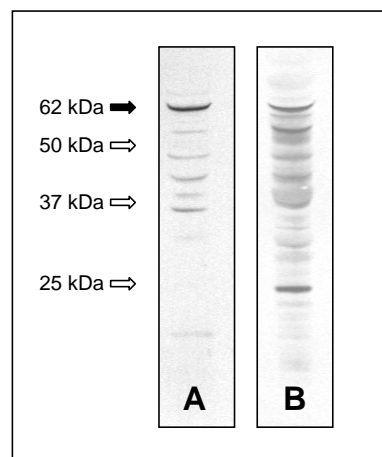


Abb. 27: Western-Blot Analyse der TEL-Degradationsprodukte nach Expression in Bakterienzellen. (A) Entwicklung mit Strep-Tactin gekoppelter Alkalischer Phosphatase, (B) Entwicklung mit dem TEL-Antiserum.

4.2.2.2.4 Expression von TEL im Protease-defizienten *E. coli*-Stamm BL21

Um die möglicherweise bereits in den Zellen erfolgende Degradation zu verhindern, wurden Expressionsversuche in dem Protease (*ompT*) defizienten Stamm BL21 durchgeführt. Zellen wurden mit dem Vektor pMPB 9-35 transformiert und verschiedene Einzelkolonien zur Anzucht von Expressionskulturen verwendet. Es zeigte sich, daß in diesem Stamm die TEL-Menge unter allen Bedingungen ca. 3-4fach höher war als in XL1-Blue. Nach Anzucht bei 30°C lag das gesamte exprimierte TEL in der löslichen Proteinfraction vor, wobei 2 h nach Induktion die maximal lösliche Menge detektiert werden konnte. Wurden die Zellen bei 37°C angezogen, konnte bereits nach 1 h das Expressionsmaximum erreicht werden. In diesem Fall wurde jedoch 50% des TEL unlöslich in Einschußkörpern abgelagert.

Die Gesamtmenge löslichen TEL war nach Anzucht bei 30°C oder 37°C vergleichbar (Abb. 28). Da die Zellen bei 37°C deutlich schneller wachsen, die gleiche lösliche TEL-

Menge produzieren und schon 1 h nach Induktion das Produktionsoptimum erreicht haben, wurde BL21:pMPB 9-35 im Folgenden ausschließlich bei diesen Bedingungen angezogen. Die in Kapitel 4.2.2.2.3 beschriebenen Abbaubanden konnten im Western-Blot nur nachgewiesen werden, wenn in der SDS-PAGE pro Spur große Zellmengen entsprechend einer $OD_{550}=0,3$ aufgetragen wurden.

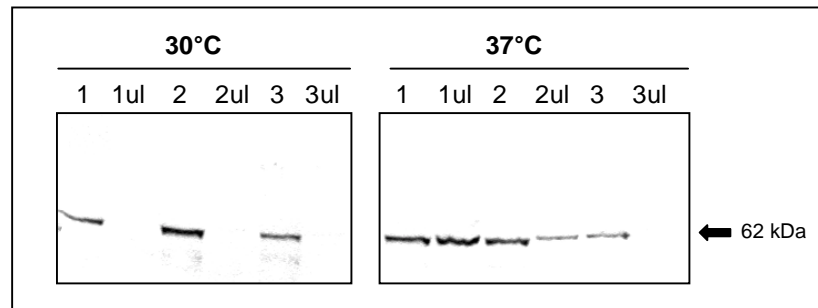


Abb. 28: Western-Blot Analyse der TEL-Expression bei 30°C und 37°C und Vergleich der löslichen und unlöslichen Fremdprotein-Anteile nach cytosolischer Expression in BL21. Es wurde derselbe Ausgangsklon für die Versuche verwendet. Die Induktion erfolgte bei $OD_{550}=0,5$. (1) 1 h nach Induktion, lösliche Fraktion; (1ul) 1 h nach Induktion, unlösliche Fraktion; (2) 2 h nach Induktion, lösliche Fraktion; (2ul) 2 h nach Induktion, unlösliche Fraktion; (3) 3 h nach Induktion, lösliche Fraktion; (3ul) 3 h nach Induktion, unlösliche Fraktion. Aufgetragen wurden Extraktmengen, die jeweils 1 ml Bakterienkultur ($OD_{550}=0,3$) entsprechen.

4.2.2.2.5 Anreicherung von TEL durch Affinitätschromatographie

Die Anreicherung von rekombinantem TEL aus *E. coli*-Rohextrakten erfolgte über eine 1 ml Säule mit Strep-Tactin-Sepharose (IBA) als Matrix. Durch Verwendung dieser Affinitätsmatrix konnte TEL deutlich angereichert, allerdings nicht rein dargestellt werden. Im Coomassiegefärbten SDS-Gel war zu erkennen, daß der Hauptteil der im Rohextrakt enthaltenen Proteine im Säulendurchlauf und der ersten Waschfraktion von der Säule eluierte (Abb. 29). In Waschfraktion 5 wurde fast kein Protein mehr nachgewiesen. Bei der Elution der an die Matrix gebundenen Proteine wurden deutlich mehr Protein-Banden als die erwartete 62 kDa-Bande angefärbt. Vor allem im Molekularmassenbereich bis 37 kDa wurden weitere Proteine co-eluiert. Die Haupt-Proteinmenge eluierte in Elutionsfraktion 3 nach 1,5 ml. In den Fraktionen 1 und 2 konnte kein TEL nachgewiesen werden.

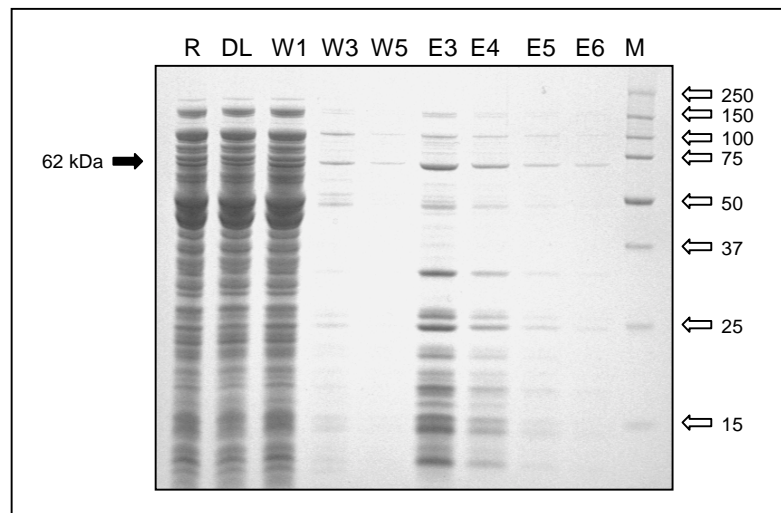


Abb. 29: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der Reinigungsfraktionen nach Affinitätsreinigung von TEL. (**R**) Rohextrakt (30 µg), (**DL**) Säulendurchlauf (30 µg), (**W1**) Waschfraktionen 1 (30 µg), (**W3**) Waschfraktion 3 (2 µg), (**W5**) Waschfraktion 5 (2 µg), (**E3**) Elutionsfraktion 3 (10 µg), (**E4**) Elutionsfraktion 4 (4 µg), (**E5**) Elutionsfraktion 5 (<2 µg), (**E6**) Elutionsfraktion 6 (2 µg), (**M**) Molekularmassenstandard.

Im Western-Blot wurde anschließend untersucht, wie effizient das TEL-Strep-Tag II-Fusionsprotein an die Matrix gebunden hat und wieder eluiert werden konnte (Abb. 30). Es zeigte sich, daß das im Rohextrakt nachweisbare TEL vollständig an die Matrix gebunden wurde und im Säulendurchlauf sowie in den Waschfraktionen nicht vorzeitig von der Säule eluierte. In den Elutionsfraktionen 3-6 ist rekombinantes TEL mit dem erwarteten Molekulargewicht nachweisbar. Die im Blot detektierte TEL-Menge ist in den einzelnen Elutionsfraktionen (E) ungefähr gleichbleibend, obwohl der Gesamtproteingehalt sinkt.

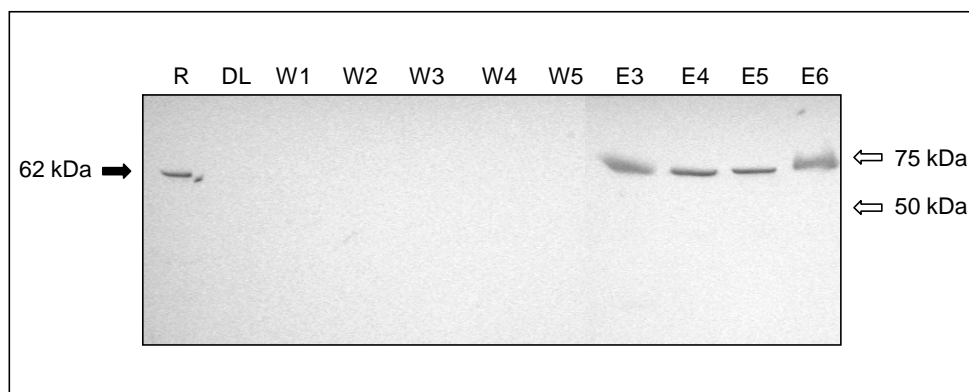


Abb. 30: Western-Blot der Reinigungsfraktionen nach Entwicklung mit Strep-Tactin-gekoppelter Alkalischer Phosphatase. (**R**) Rohextrakt (30 µg), (**DL**) Rohextrakt nach Säulendurchlauf (30 µg), (**W1**) Waschfraktionen 1 (30 µg), (**W2**) Waschfraktion 2 (9 µg), (**W3**) Waschfraktion 3 (2 µg), (**W4**) Waschfraktion 4 (2 µg), (**W5**) Waschfraktion 5 (2 µg), (**E3**) Elutionsfraktion 3 (10 µg), (**E4**) Elutionsfraktion 4 (4 µg), (**E5**) Elutionsfraktion 5 (2 µg), (**E6**) Elutionsfraktion 6 (2 µg), (**M**) Molekularmassenstandard.

Durch Erhöhung des Puffervolumens beim Waschen und durch Zugabe von 0,05% (v/v) Triton X-100 zum Waschpuffer konnte die Menge der verunreinigenden Proteine nicht verringert werden. Die Verwendung von Triton X-100 im Waschpuffer bewirkte außerdem, daß bereits während der Waschschriffe rekombinantes TEL von der Säule eluierte (Daten nicht gezeigt).

Die Reinigung von TEL aus BL21-Extrakten wurde entsprechend durchgeführt. Die Ergebnisse waren identisch mit denen aus XL1-Blue-Extrakten.

4.2.2.2.6 Untersuchung der Stabilität von angereinigten TEL-Präparationen

Die Stabilität des Proteins wurde im Bakterien-Rohextrakt untersucht, um zu klären, ob Faktoren aus den Bakterienzellen für das labile Verhalten von TEL verantwortlich sind. Es stellte sich heraus, daß bereits nach 2 h bei Raumtemperatur die detektierbare Proteinmenge um ca. 90% reduziert war. Im angereinigten Extrakt waren nach dieser Zeitspanne noch ca. 50% des ursprünglich eingesetzten Proteins vorhanden. Der Blot zeigt deutlich, daß es sich bei den beschriebenen Banden tatsächlich um TEL-spezifische Fragmente handelt, da diese Banden im Verlauf der Inkubation verstärkt auftreten und immer weitere niedermolekulare Banden hinzukommen (Abb. 31).

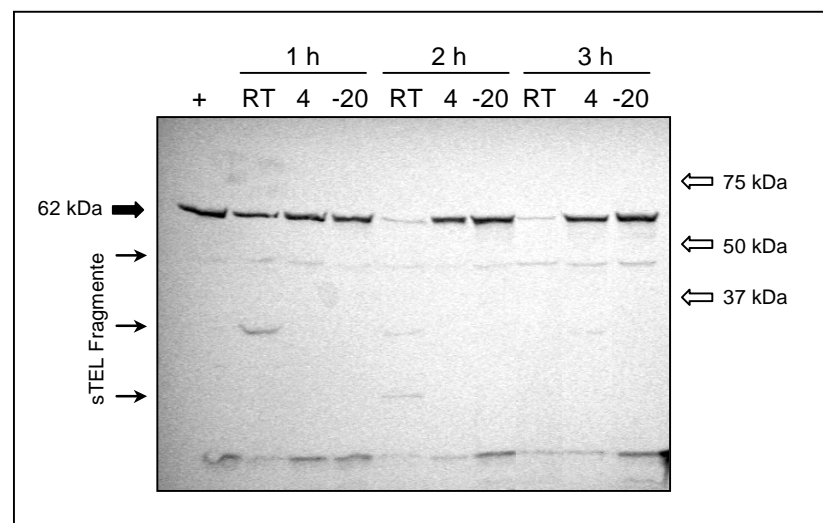


Abb. 31: Western-Blot Analyse zum Test der Stabilität von TEL im BL21-Rohextrakt. Die Proben wurden für 1-3 h bei Raumtemperatur (RT), 4°C (4) oder -20°C (-20) in Kunststoffgefäßen inkubiert und anschließend sofort in SDS-Ladepuffer gekocht. (+) Als Nullwert wurde nicht-inkubierter Rohextrakt aufgetragen. Die schwarzen Pfeile markieren die Molekularmassen der entstehenden TEL-Abbaubanden. Der Blot wurde mit Strep-Tactin-AP Konjugat entwickelt.

Durch Lagerung bei 4°C konnte der Degradationsprozeß deutlich verlangsamt werden. Nach 18 bzw. 24 h konnte aber auch in diesem Fall nur noch minimale TEL-Mengen im Blot nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Nur bei -20°C war das Protein stabil und auch 3 Monate später noch in vergleichbarer Menge detektierbar.

Parallel wurde die Stabilität von rekombinantem TEL mit der angereinigten Elutionsfraktion 3 untersucht (Abb. 32). Die Proben wurden für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert und nach jeweils 1 h eine Probe im Western-Blot analysiert. Wie sich herausstellte, wurde das Signal im Laufe der Zeit immer schwächer. Diese Tendenz zeigte sich noch stärker, wenn die Probe in einem Glasgefäß statt in Kunststoff gelagert wurde. Banden mit geringerem Molekulargewicht als dem von intaktem TEL wurden im Blot nicht markiert. Außerdem fiel auf, daß in den angereinigten TEL-Proben keine Degradationsbanden detektiert wurden, so daß davon ausgegangen wird, daß die Fragmente während der Reinigung abgetrennt oder vollständig degradiert werden.

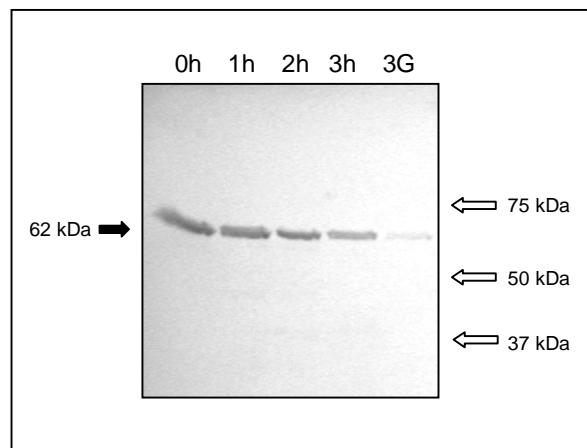


Abb. 32: Western-Blot Analyse der Abreicherung von rekombinantem TEL. Die aufgetragenen Proben wurden für 0-3 h bei Raumtemperatur inkubiert. (3G) Proteinextrakt wurde für 3 h in Glas gelagert.

Durch Zugabe von Proteaseinhibitoren (Sigma) konnte der Abbauprozess bei Raumtemperatur nur geringfügig, bei 4°C jedoch deutlich verlangsamt werden (Abb. 33).

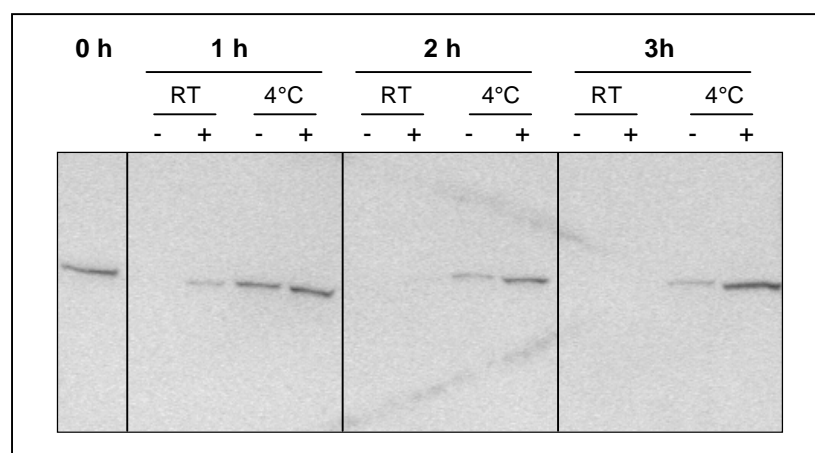


Abb. 33: Western-Blot Analyse der TEL-Degradation nach Zugabe von Proteaseinhibitoren. Die Proben wurden 0-3 h bei Raumtemperatur und 4°C in Kunststoffgefäßen inkubiert. (RT) Inkubation bei Raumtemperatur, (4°C) Inkubation bei 4°C, (+) Zugabe von Protease Inhibitoren, (-) ohne Protease Inhibitoren. Die Entwicklung erfolgte mit Strep-Tactin gekoppelter AP.

Um festzustellen, ob die Abnahme des TEL-Signals außerdem durch unspezifische Wechselwirkungen mit den Gefäßoberflächen hervorgerufen wird, wurde angereicherter TEL-Extrakt parallel in Plastik-, Glas und Teflon-Gefäßen gelagert, die z.T. zusätzlich über Nacht mit Milchpulver inkubiert worden waren.

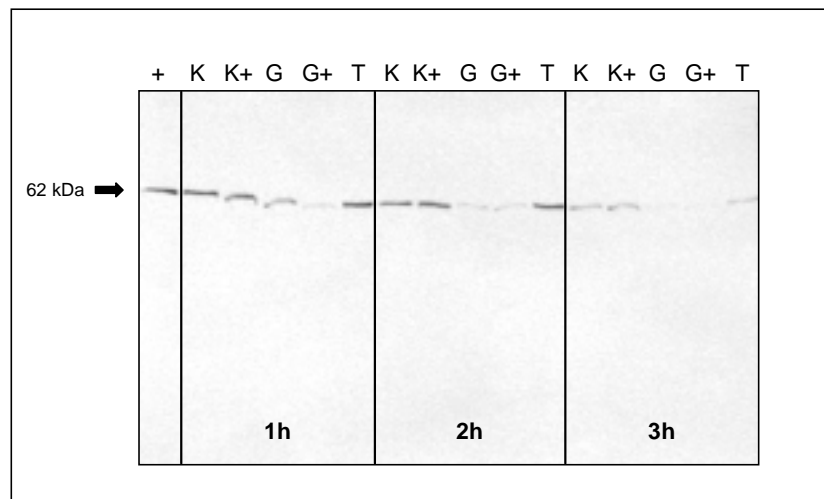


Abb. 34: Western-Blot Analyse zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit der TEL-Degradation in Gefäßen unterschiedlichen Materials. (+) TEL-Extrakt vor Inkubation, (K) Kunststoff, (K+) Kunststoff mit Milchpulver vorinkubiert, (G) Glas, (G+) Glas mit Milchpulver vorinkubiert, (T) Teflon.

Die Western-Blot Analyse zeigte, daß die nachweisbare Proteinmenge nach Inkubation in allen Gefäßen nach 3 h bereits deutlich abgenommen hat (Abb. 34). In den Glasgefäßen verläuft die Reduzierung der TEL-Menge am schnellsten, so daß bereits nach 1 h kaum noch Protein nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu ist sowohl in Kunststoff- als auch in Teflon-Röhrchen nach 2 h die Menge detektierbarer TEL noch mit der Ausgangsmenge vergleichbar. Erst nach 3 h ist hier ein deutlich verringertes Signal zu sehen. Weder bei Glas- noch bei Kunststoff-Gefäßen hatte das Absättigen der Oberflächen mit 5% Milchpulver einen Einfluß auf die detektierbare TEL-Menge.

4.2.3 Stabile Transformation von Kartoffelpflanzen

4.2.3.1 Konstruktion der TEL-Expressionskassetten

Für die Expression von synthetischem TEL in Kartoffelpflanzen wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. In einem Fall sollte das Fremdprotein in den Apoplasten der Pflanzenzellen sekretiert werden. Um das zu erreichen, wurde an die *sTEL*-DNA im 5'-Bereich die Sequenz des α -Amylase Signalpeptids aus Gerste (Rogers & Milliman, 1983) kloniert. Im zweiten Ansatz sollte das rekombinante TEL in die Plastiden der Pflanzen importiert werden. Dafür wurde an den N-Terminus des TEL das Signalpeptid der AGPase aus Raps (Zawodny &

Martini, 2000) fusioniert. Die Expression des in den Apoplasten sekretierten TEL erfolgte unter Kontrolle des 35S-Promotors. Für die Klonierung des plastidären Konstrukts wurde der 2x 35S-Promotor mit Translationsverstärker (von Arnim *et al.*, 1998) verwendet. Als Terminationssignal wurde in beiden Konstrukten der 35S-Terminator verwendet (Abb. 35).

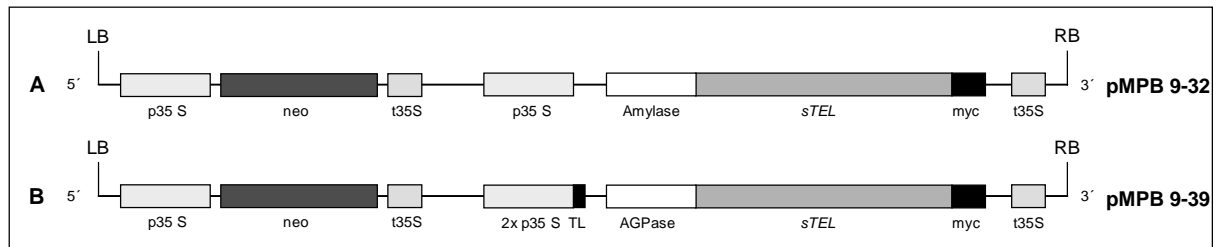


Abb. 35: Aufbau der T-DNA-Region der binären Vektoren pMPB 9-32 (A) und pMPB 9-39 (B). (LB) linke T-DNA Grenze, (RB) rechte T-DNA Grenze, (p35S) 35S-Promotor, (2x35S TL) 2x verstärkter 35S-Promotor plus Translationsverstärker, (neo) Neomycin-Phosphotransferase II, (Amylase) α -Amylase Signalsequenz aus Gerste, (AGPase) Signalsequenz der AGPase aus Raps, (sTEL) synthetische TEL DNA, (myc) c-myc Tag, (t35S) 35S-Terminator.

Nach der Transformation wurden ca. 50 unabhängige Kanamycin-resistente Linien pro Konstrukt regeneriert. Diese Pflanzen wurden auf Fremdgenexpression untersucht.

4.2.4 Analyse der transgenen TEL-Pflanzen

4.2.4.1 Northern-Blot Analyse

Die Transkriptmenge der transgenen Linien wurde im Northern-Blot untersucht. Pro Pflanze wurde Gesamt-RNA aus 2-3 Sterilkulturlättern isoliert. Nach Gelelektrophorese und Transfer der RNA auf eine Nitrozellulose-Membran wurde diese mit der spezifischen 2 kb langen sTEL-Sonde hybridisiert, die für die Pflanzen beider Konstrukte verwendet werden konnte.

Von den 51 Linien, die mit dem Konstrukt pMPB 9-32 (sekretiertes Konstrukt) transformiert worden waren, konnte in 41 Pflanzen ein positives Signal mit einer Größe von ca. 2,4 kb detektiert werden. Die von der Länge des Transgens abgeleitete Mindestgröße beträgt 2,2 kb. Als Negativkontrollen wurde jeweils RNA von Wildtyp-Pflanzen und von Linien, die mit derselben T-DNA, aber einem anderen Fremdgen (sLOX) transformiert worden waren, verwendet. In beiden Fällen führte die Hybridisierung mit der sTEL-Sonde zu keinen unspezifischen Signalen.

Von den 50 getesteten pMPB 9-39-Linien (plastidäres Konstrukt) zeigten 33 Pflanzen ein deutliches Signal von etwa 2,4 kb Größe (Beispiel Abb. 36). Die erwartete RNA-Länge ohne poly(A)-Schwanz beträgt 2,3 kb.

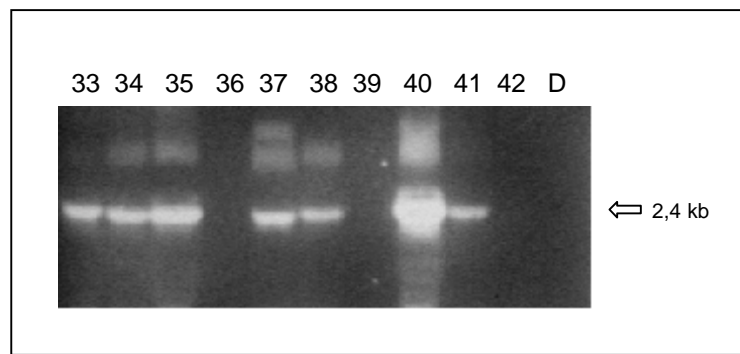


Abb. 36: Northern-Blot von Gesamt-RNA verschiedener pMPB 9-39-Linien (plastidäres Konstrukt). (33-42) Bezeichnung der einzelnen getesteten Linien, (D) RNA-Probe des Wildtyps Désirée. Als Größenstandard wurde der DIG-markierte „RNA Molecular Weight Marker II“ (Roche) verwendet. Die Detektion erfolgte mit CDP-Star.

In folgender Tabelle sind die Ergebnisse der Northern-Blot Analyse zusammengefaßt:

Tab. 13: Vergleich der Ergebnisse der Northern-Blot Analyse aller getesteten Linien.

Signalstärke	++++	+++	++	+	-	positiv
pMPB 9-32	1	2	8	30	10	80%
pMPB 9-39	2	7	12	12	17	66%

Um Gewächshausmaterial für die Western-Blot Analysen zur Verfügung zu haben, wurden je Konstrukt 16 Linien mit nachweisbaren Transkriptmengen vermehrt und zur Miniknollenproduktion ins Gewächshaus ausgebracht. Nach vier Wochen wurden von jeder Pflanze 3-4 Blätter geerntet, weitere 3 Monaten später erfolgte die Ernte der Miniknollen.

4.2.5 Western-Blot Analyse

4.2.5.1 Testen des TEL-Antiserums

Zur Western-Blot Analyse der Tropoelastin-Pflanzen (pMPB 9-32, pMPB 9-39) wurde ein spezifisches Antikörper-Serum verwendet, das freundlicherweise von J. Rosenbloom (University of Pennsylvania, Philadelphia) zur Verfügung gestellt wurde. Das Serum wurde zunächst auf seine Verwendbarkeit mit Pflanzenextrakt untersucht. Dafür wurde die rekombinante Positivkontrolle aus *E. coli* mit Pflanzenextrakt vermischt und ein Western-Blot angeschlossen. Es zeigte sich, daß das Antiserum TEL spezifisch markiert und nur minimal Hintergrund in den Pflanzenextrakten zu erkennen ist (Abb. 37). Das TEL-Antiserum konnte also für die Pflanzenanalysen verwendet werden.

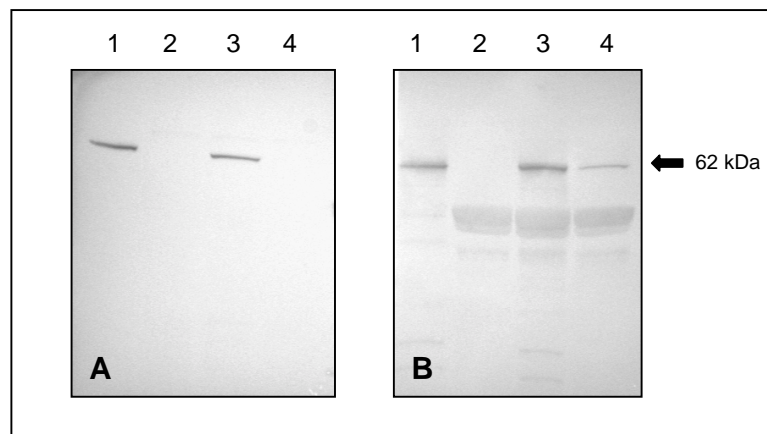


Abb. 37: Test des TEL-Antiserums im Western-Blot. (1) BL21-Extrakt 20µl, (2) Kartoffel-Proteinextrakt (WT) 20 µg, (3) WT (20 µg) + BL21-Extrakt (20 µl), (4) WT (20 µg) + BL21-Extrakt (2 µl). (A) Die Detektion erfolgte mit Strep-Tactin gekoppelter Alkalischer Phosphatase, (B) Die Detektion erfolgte mit TEL-Antiserum.

Die Nachweisgrenze des TEL-Antiserums wurde nachfolgend im Western-Blot abgeschätzt. Als Mengenstandard wurde ein 28 kDa schweres Kontrollprotein mit Strep-Tag der Firma IBA eingesetzt. Die Bestimmung der Detektionsgrenzen von den verwendeten Antikörpersystemen ergab, daß mit dem TEL-Antiserum Proteinmengen unter 50 ng nicht mehr nachgewiesen werden können. Anhand dieser Detektionsgrenze wurden Rückschlüsse auf die für einen Nachweis erforderlichen Expressionshöhen gezogen. Da im Western-Blot maximal 100 µg Gesamtprotein analysiert werden, müßten in den Pflanzen Expressionshöhen von ~0,05-0,1% erreicht werden, um das Fremdprotein nachweisen zu können.

4.2.5.2 Nachweis von TEL in Blattextrakten

Für die Analyse der transgenen Linien wurden Extrakte aus Sterilkulturblättern von 51 unabhängigen Linien hergestellt. 100 µg lösliches Gesamtprotein wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Sowohl in den Linien mit dem plastidären als auch mit dem sekretierenden Konstrukt konnte kein Tropoelastin nachgewiesen werden. Weiterhin wurden noch Blätter aus dem Gewächshaus von je 16 Linien/Konstrukt analysiert. In zwei Linien (#9 und #40) der Pflanzen mit plastidär exprimiertem TEL konnte im Blot reproduzierbar eine sehr schwache Bande detektiert werden, die in den übrigen 14 Linien und im Wildtyp-Extrakt nicht markiert wurde (Abb. 38).

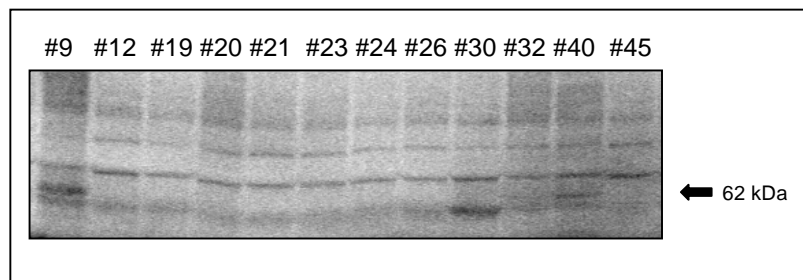


Abb. 38: Nachweis von plastidär lokalisiertem TEL aus Blattproben im Western-Blot. (#9-45) Aufgetragen sind einzelne Linien. Bei den Linien #9 und #40 ist bei 62 kDa eine zusätzliche sehr schwache Bande zu erkennen, die in anderen Linien und im Wildtyp nicht detektiert wird.

Es wurde versucht, TEL durch Immunpräzipitation aus den Linien #9 und #40 mit dem TEL-Antiserum anzureichern. Nach Analyse der Proben im Western-Blot zeigte sich aber, daß TEL in den beiden Linien nicht angereichert werden konnte. Anhand der Positivkontrolle (bakteriell synthetisiertes TEL, mit Pflanzenextrakt vermischt) wurde deutlich, daß TEL im Verlauf der Immunpräzipitation um mindestens 50% dezimiert wird, so daß davon auszugehen ist, daß die geringen TEL-Mengen in den Linien #9 und #40 während des Versuchs degradiert werden.

In den TEL-Linien mit sekretiertem TEL konnte kein Fremdprotein nachgewiesen werden.

4.2.5.3 Isolierung von Plastiden

Alternativ wurde zur Anreicherung plastidärer Proteine von 4 Transformanten mit plastidär lokalisiertem TEL Plastiden isoliert und die Proteine im Western-Blot analysiert. Für die Isolierung wurden Blätter von 4 Wochen alten Gewächshaus-Pflanzen verwendet. Auch hier konnte in den Linien #9 und #40 kein TEL nachgewiesen werden, obwohl durch die Präparation der Plastiden ein Anreicherungsfaktor 2-3 erreicht wird (persönliche Mitteilung Dr. E. Neuhaus, Pflanzenphysiologie, Universität Kaiserslautern).

4.2.5.4 Analyse von Knollenmaterial

Da die Kartoffelknollen das eigentliche Zielgewebe zur Produktion der Fremdproteine sind, wurden die im Gewächshaus angezogenen Miniknollen auf TEL-Gehalt getestet. Dafür wurden die Knollen aufgeschlossen und im Western-Blot analysiert. Nach Entwicklung mit dem TEL-Antiserum konnte in keiner Pflanze TEL detektiert werden.

4.2.5.5 Transiente Tests mit GFP-Fusionsproteinen

Da in transgenen Linien der mit pMPB 9-32 und pMPB 9-39 transformierten Kartoffelpflanzen kein oder nur wenig (Linien #9 und #40) Protein in Blatt- und Knollengewebe nachzuweisen war, sollte durch transiente Expression in Tabak-Protoplasten gezeigt werden, daß TEL prinzipiell in Pflanzenzellen produziert werden kann.

4.2.5.6 Herstellung der Konstrukte

Um zu überprüfen, ob die TEL-mRNA korrekt translatiert werden kann, wurde ein GFP-Fusionsprotein mit TEL verwendet. Hierfür wurde im Vektor pMPB 9-47 die *gfp*-Sequenz an das 3'-Ende von *sTEL* kloniert (Abb. 39).

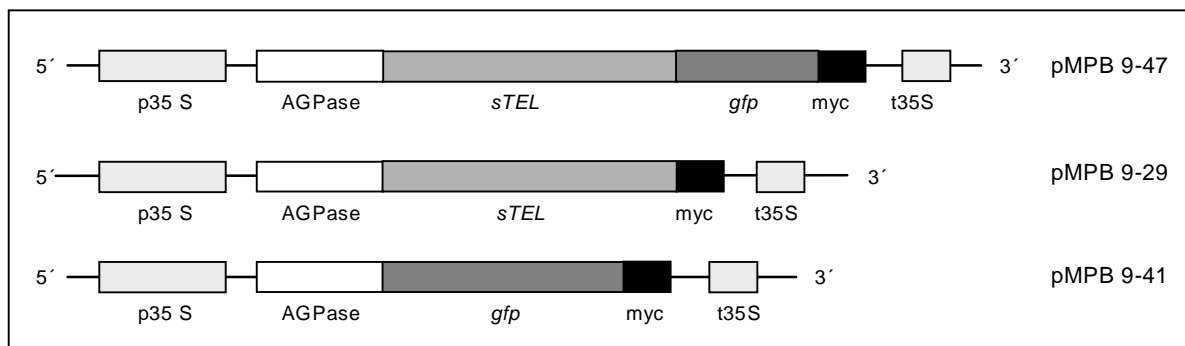


Abb. 39: Schematische Darstellung der Expressionskassetten zur transienten Expression von TEL und TEL:GFP in Protoplasten. Die Konstrukte bestehen aus folgenden Elementen (**p35S**) = 35S-Promotor, (**AGPase**) = cDNA des Signalpeptids der AGPase aus Raps, (**gfp**) = cDNA des grün fluoreszierenden Proteins aus *Aequorea victoria*, (**sTEL**) = synthetische *TEL* DNA, (**myc**) = c-myc Tag, (**t35S**) = 35S-Terminator.

4.2.5.7 Fluoreszenzuntersuchungen nach transienter Expression von TEL-GFP Fusionsproteinen

Für transiente Expressionsstudien von TEL:GFP wurden BY2-Protoplasten mit dem Plasmid pMPB 9-47 transformiert. Nach einem Tag konnte eine schwache Grünfluoreszenz der Plastiden beobachtet werden, was auf eine funktionelle Expression hinweist. Das Signal war jedoch deutlich schwächer als das des nativen, plastidär lokalisierten GFP.

4.2.5.8 Western-Blot Analyse

Durch Western-Blot Analyse wurde das über GFP-Fluoreszenz nachgewiesene Fusionsprotein zusätzlich immunologisch detektiert. Die Protoplasten wurden 1 Tag nach der Transformation geerntet. Nach dem Aufschluß der Zellen wurden die Proteinextrakte der mit pMPB 9-41 und pMPB 9-47 transformierten Protoplasten immunologisch untersucht.

In Plastiden importiertes GFP-Kontrollprotein konnte mit dem spezifischen GFP-Antikörper (Clontech) eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 40, Spur 1). Erfolgte die Detektion jedoch über den c-myc Antikörper konnte nur ein sehr schwaches Signal detektiert werden (Abb. 40, Spur 5). Der Vergleich der Detektionsgrenzen beider Antikörper ergab, daß mit dem GFP-Antikörper-System 5 ng, mit dem c-myc Antikörper aber lediglich 50 ng gereinigtes Kontrollprotein nachgewiesen werden konnten (persönliche Mitteilung I. Wenderoth, MPB Cologne).

TEL:GFP (abgeleitete Größe: 90 kDa) konnte weder mit dem GFP- (Abb. 40, Spur 2) noch mit dem spezifischen TEL-Antikörper (Abb. 40, Spur 7) im Western-Blot nachgewiesen werden.

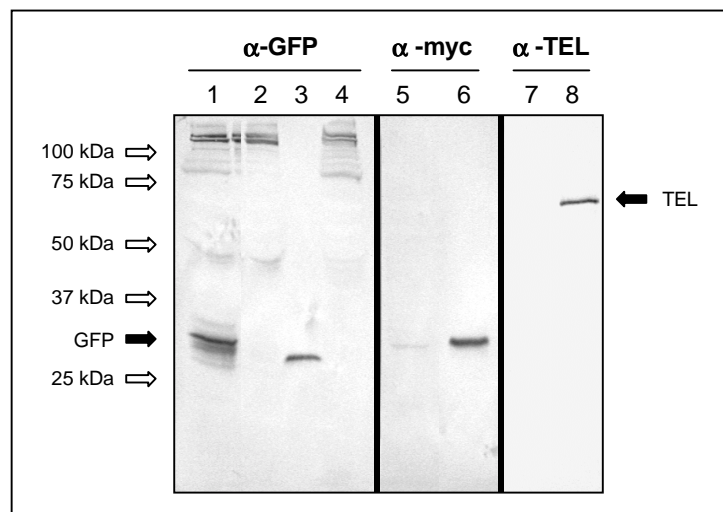


Abb. 40: Western-Blots der BY2-Protoplastenextrakte nach transienter Expression. (1) pMPB 9-41 50 µg, (2) pMPB 9-47 40 µg, (3) GFP Kontrollprotein 5 ng, (4) Extrakt nicht-transformierter Protoplasten 50 µg, (5) pMPB 9-41 50 µg, (6) Kontrollprotein (scFv) mit c-myc Tag, (7) pMPB 9-47 40 µg, (8) TEL Bakterienextrakt angereinigt 4 µg. Der immunologische Nachweis wurde mit folgenden Antikörpern durchgeführt: (**α-GFP**) GFP-Antikörper monoklonal, (**α-myc**) c-myc Antikörper monoklonal, (**α-TEL**) TEL-Antiserum.

4.2.5.9 Sandwich-ELISA

Um die mikroskopisch nachgewiesene Expression des TEL-GFP Fusionsproteins auch immunologisch nachweisen und quantifizieren zu können wurde der im Vergleich zum Western-Blot sensitivere Sandwich-ELISA eingesetzt. Die Mikrotiter-Platten wurden mit spezifischem GFP-Antiserum (Invitrogen) abgesättigt und 100-150 µg Proteinextrakt der Protoplasten eingesetzt. Nach Entwicklung der Platten mit dem c-myc Antikörper konnte sowohl das GFP-Kontrollprotein als auch das Fusionsprotein TEL-GFP mit deutlichem Signal nachgewiesen werden.

Tab. 14: Ergebnisse des Sandwich-ELISA nach transienter Expression verschiedener *gfp*-Konstrukte in BY2-Protoplasten. Gemessen wurden die OD₄₀₅-Werte 45 min nach Start der AP-Farbreaktion. Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt (V1, V2). Angegeben ist jeweils der Mittelwert von 3 Parallelansätzen. Die Einzelwerte wichen maximal 10% vom Mittelwert ab.

Transformiertes Plasmid	V1	V2
Negativkontrolle	0,122	0,115
pMPB 9-41 (GFP plastidär)	1,975	2,072
pMPB 9-47 (TEL-GFP plastidär)	0,761	1,321

Das GFP Signal war um Faktor 1,5 - 2,6 stärker als das von TEL:GFP. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Daten der mikroskopischen Analyse, wo GFP eine deutlich stärkere Fluoreszenz zeigte als das Fusionsprotein.

5 DISKUSSION

5.1 Expression von TEL und LOX in Pflanzen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein pflanzliches Expressionssystem zur Herstellung der humanen Proteine Tropoelastin und Lysinoxidase entwickelt werden. Die Expression beider Proteine wurde sowohl im Apoplasten als auch in den Plastiden der Zellen von Kartoffelpflanzen untersucht. Die Bestimmung des Fremdproteingehalts in den transgenen Pflanzen erfolgte durch Western-Blot Analyse. Die LOX-Pflanzen wurden mit einem monoklonalen c-myc Antikörper, die TEL-Pflanzen mit dem spezifischen TEL-Antiserum analysiert.

In den transgenen LOX-Pflanzen konnte keine Linie mit detektierbarem LOX-Gehalt identifiziert werden.

Die mit dem sekretierten Konstrukt transformierten TEL-Pflanzen zeigten ebenfalls keine nachweisbaren TEL-Gehalte. In den Linien der plastidären TEL-Pflanzen konnten jedoch zwei Linien identifiziert werden (Linien #9 und #40), die im Western-Blot eine schwache Bande bei 62 kDa aufwiesen. Abgeleitet von der aufgetragenen Proteinmenge und der Detektionsgrenze des TEL-Antiserums wurde eine Expressionshöhe von 0,05% TEL in Kartoffelblättern geschätzt.

Parallel zu den Pflanzenanalysen wurden GFP-Fusionsproteine hergestellt und diese transient in Tabakprotoplasten exprimiert. Auf diese Weise konnten die Fusionsproteine nach erfolgreicher Translation direkt durch die Fluoreszenz des GFP sichtbar gemacht werden.

Nach transients Expression des Fusionsproteins TEL:GFP mit plastidärem Signalpeptid konnte fluoreszenzmikroskopisch eine Grünfluoreszenz in den Plastiden der Protoplasten beobachtet werden, die jedoch deutlich schwächer als die der GFP-Kontrolle war. Im Sandwich-ELISA konnte das GFP-Fusionsprotein auch immunologisch detektiert werden. Die Translation und die Faltung des Fusionsproteins erfolgen also in Pflanzenzellen korrekt, es werden aber nur geringe Proteinmengen akkumuliert.

Für LOX zeigten die transienten Tests, daß das reife Protein nicht in Tabakprotoplasten exprimierbar ist. Erst nach N-terminaler Fusion des Propeptids konnte transient GFP-Fluoreszenz beobachtet und das Protein im Sandwich-ELISA nachgewiesen werden.

Im folgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse der Pflanzenanalysen diskutiert werden. Die Diskussion ist dabei speziell auf die Expression humaner Proteine in pflanzlichen Expressionssystemen fokussiert, da die verwendeten TEL- und LOX-Isoformen ebenfalls aus humanen Organismen stammen.

Die Expression von Proteinen humanen Ursprungs in Pflanzen wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben. Der Vergleich der Expressionshöhen zeigt, daß abgesehen von Antikörpern und Antikörperfragmenten die meisten Proteine unter 0,1% des löslichen Gesamtproteins akkumulieren, was mit den Ergebnissen dieser Arbeit korreliert.

Zum Beispiel wurde α -Lactalbumin von Takase & Hagiwara (1998) im Apoplasten transgener Tabakpflanzen exprimiert. Dieses Protein reguliert die Laktose-Biosynthese in den Brustdrüsen von Säugetieren und hat ein Molekulargewicht von 14,1 kDa. In 1 g Blattmaterial konnten in der Western-Blot Analyse 5 μ g α -Lactalbumin nachgewiesen werden, was einer Expressionshöhe von ca. 0,02% des gesamten löslichen Proteins (TSP) entspricht.

Humanes Serumalbumin (HSA) wurde von Sijmons *et al.* (1990) im Apoplasten von Kartoffelpflanzen hergestellt. Im menschlichen Organismus wird HSA in der Leber exprimiert und in den extrazellulären Raum sekretiert. Das 66,5 kDa schwere Protein machte in einigen Linien maximal 0,02% des TSP in Blättern aus. Der Nachweis erfolgte durch einen spezifischen Antikörper im Immunoblot.

Humanes β -Casein (25 kDa) ist von Chong *et al.* (1997) ebenfalls im Apoplasten von Kartoffelpflanzen exprimiert worden. Das native Protein ist ein Milchprotein, das in mehreren Isoformen mit unterschiedlichen Phosphorylierungs-Mustern vorkommt. Die beste transgene Linie akkumulierte nur eine Proteinmenge von 0,01% TSP. Auch hier erfolgte der Nachweis durch Analyse der Blattextrakte im Western-Blot.

Von Leite *et al.* (2000) konnten das humane Wachstumshormon, ein 22 kDa schweres Protein, im Apoplasten von Tabaksamen in größeren Mengen produzieren. In den Samen konnten Expressionshöhen bis zu 0,16% des löslichen Proteins erzielt werden.

Lediglich Antikörper lassen sich in deutlich größeren Mengen in Pflanzen produzieren (Übersicht in Conrad & Fiedler, 1998). So konnten bei Expression des scFv-Oxazolone und scFv-Abszissinsäure im ER von Tabak- und Kartoffelpflanzen Expressionshöhen von 2 - 6,8% des löslichen Proteins erreicht werden (Fiedler *et al.*, 1997; Artsaenko *et al.*, 1998). Die Expression von vollständigen und biologisch aktiven IgG-Molekülen konnte bereits in Tabakpflanzen gezeigt werden. Mit dem 35S-Promotor konnten Mengen bis zu 1,3% des TSP in Blattmaterial nachgewiesen werden (Hiatt *et al.*, 1989).

Die aufgeführten Beispiele zeigen, daß die Expression humaner, sekretierter Proteine in Pflanzenzellen möglich ist, jedoch meist nur zu geringen Ausbeuten führt. Dabei besteht offenbar keine Korrelation zwischen der erzielten Expressionshöhe und der Molekularmasse des Fremdproteins. Der Vergleich der Mengen rekombinant hergestellter humaner Fremdproteine mit Ausnahme von Antikörpern zeigt, daß die geschätzte Expressionshöhe von 0,05% des plastidär lokalisierten TEL durchaus im zu erwartenden Bereich liegt.

Der Nachweis der rekombinanten Proteine erfolgt standardmäßig durch Western-Blot Analysen. Dabei werden z.T. Antikörper eingesetzt, die Proteinmengen unter 0,01% des eingesetzten Gesamtproteins detektieren können. Dies könnte der Grund sein, warum bei den in dieser Arbeit hergestellten TEL-Pflanzen lediglich zwei positive Linien selektiert werden konnten. Da die verwendeten Antikörpersysteme erst ein Fremdproteingehalt ab 0,05% des Gesamtproteins erkennen können, ist anzunehmen, daß die Linien #9 und #40 die beiden Pflanzen mit der stärksten Expression sind. Alle anderen Linien weisen wahrscheinlich niedrigere Akkumulationsmengen auf, so daß eine Detektion nicht erfolgen konnte. Diese Hypothese kann jedoch erst dann bestätigt werden, wenn Antikörper zur Verfügung stehen, deren Sensitivität im Bereich von 5-10 ng liegt. Auch in anderen Arbeiten wurde beschrieben, daß nur wenige Linien eine hohe Expression zeigen, während die durchschnittliche Expression deutlich geringer ist. Zum Beispiel wurden nach Expression des scFv-Oxazolon 45 Linien untersucht. 47% der Linien wiesen scFv-Gehalte unter 0,5% auf, 38% der Linien zwischen 0,5 - 1% und nur 15% mehr als 1%. Unter diesen 7 Linien waren lediglich zwei, die 2% des scFv enthielten (Artsaenko *et al.*, 1998). Eine ähnliche Verteilung hinsichtlich der Expressionsstärken ist wahrscheinlich auch bei den transgenen TEL-Linien zu erwarten. Tab. 15 zeigt eine Übersicht verschiedener rekombinant in Pflanzen exprimierter Proteine.

Tab. 15: Expression verschiedener Proteine nach Expression in Pflanzen.

Protein	MW	Kompartiment	Pflanzenart	Expressionshöhe	Referenz
α -Lactalbumin	14,1 kDa	Apoplast	Tabak	~0,02% (5 μ g/g Blatt)	Takase & Hagiwara, 1998
β -Casein	25 kDa	Apoplast	Kartoffel	0,01% TSP (Blatt)	Chong <i>et al.</i> , 1997
HSA	66,5 kDa	Apoplast	Kartoffel	0,02% TSP (Blatt)	Sijmons <i>et al.</i> , 1990
Wachstumshormon	22 kDa	Apoplast	Tabak	0,07 - 0,16% TSP (Samen)	Leite <i>et al.</i> , 2000
Lactoferrin	80 kDa	Vakuole	Tabak	0,1% - 0,3% TSP (Blatt)	Salmon <i>et al.</i> , 1998
		ER	Kartoffel	0,01 - 0,1% TSP (Knollen)	Chong & Langridge, 2000
Collagen I	47 kDa	Apoplast	Tabak	~0,3% (0,1 mg/g Blatt+Sproß)	Ruggiero <i>et al.</i> , 2000
Tropoelastin	62 kDa	Apoplast	Kartoffel	nicht nachweisbar	diese Arbeit
		Plastid	Kartoffel	~ 0,05% TSP (Blatt)	diese Arbeit
PBP (GVGVP) ₁₂₁	60 kDa	Cytosol	Tabak	viel (nicht näher bestimmt)	Zhang <i>et al.</i> , 1996
		Chloroplast	Tabak	wenig (Plastidentransformation)	Guda <i>et al.</i> , 2000
Somatotropin	22 kDa	Chloroplast	Tabak	7% TSP (Plastidentransformation)	Staub <i>et al.</i> , 2000
scFv-Oxazolon	28 kDa	ER	Kartoffel	2% TSP	Artsaenko <i>et al.</i> , 1998
scFv-Oxazolon	28 kDa	ER	Tabak	4% TSP (Blatt) 1% TSP (Samen)	Fiedler <i>et al.</i> , 1997
		Apoplast	Tabak	0,2% TSP (Blatt)	
scFv-Abszisionsäure	30 kDa	ER	Tabak	6,8% TSP (Blatt)	Fiedler <i>et al.</i> , 1997
				0,75% TSP (Samen)	

Damit in Pflanzen gewinnbringend Proteine hergestellt werden können, sollte das Fremdprotein mindestens 1% des Gesamtproteins ausmachen, wenn eine Aufreinigung erfolgen soll (Kusnadi, 1997). Da fast alle humanen Proteine einschließlich TEL deutlich unter dieser Grenze bleiben, wurden verschiedene Ansätze verfolgt, um die Menge der rekombinanten Proteine zu erhöhen.

Ein häufig diskutierter Faktor ist der verwendete Promotor. Zur Steuerung der Expression in Pflanzen werden verschiedene Promotorarten verwendet. Am häufigsten werden konstitutive Promotoren eingesetzt, die ubiquitär in der gesamte Pflanze aktiv sind. Hierzu gehört zum Beispiel der 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus (Odell *et al.*, 1985). Durch Duplikation der Promotorsequenz konnten zudem eine Variante dieses Promotors generiert werden, die zu einer deutlich höheren Transkriptionsrate führt (Kay *et al.*, 1987).

Zum anderen werden induzierbare und organspezifische Promotoren zur Fremdgenexpression in Pflanzen eingesetzt. Ein häufig benutzter induzierbarer Promotor ist zum Beispiel der Auxin-induzierbare Mas-Promotor aus *Agrobacterium tumefaciens* (Mannopinsynthese P2-Promotor, Velten *et al.*, 1984). Als organspezifischer Promotor wird unter anderem der blattspezifische Promotor der kleinen RuBisCO-Untereinheit verwendet (RbcS-3C, Sugita *et al.*, 1987). Die Genexpression von *sLOX* und *sTEL* wurde unter die Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus gestellt. Für das plastidäre *sTEL*-Konstrukt wurde die verstärkte Variante dieses Promotors eingesetzt.

Auch die Expression von α -Lactalbumin wurde durch den nicht-verstärkten 35S-Promotor reguliert (Takase & Hagiwara, 1998). Aufgrund der niedrigen Expressionshöhe von 0,02% wird diskutiert, ob dies mit dem verwendeten Promotor zusammenhängen könnte. Da jedoch mit demselben Promotor Einzelkettenantikörper bis zu 2% des löslichen Gesamtproteins produziert werden konnten (Artsaenko *et al.*, 1998), kann die Promotorstärke nicht allein der limitierende Faktor für die unterschiedlichen Expressionshöhen sein. Es gibt zudem weitere Beispiele, die zeigen, daß auch die Verwendung des verstärkten 35S-Promotor zu keiner höheren Fremdprotein-Akkumulation führt. HSA wurde von Sijmons *et al.* (1990) in Kartoffelpflanzen mit diesem verstärkten Promotor exprimiert. Zusätzlich wurde noch der 3'-untranslatierte Bereich des Alfalfa Mosaikvirus RNA4-Gens in die Konstrukte eingefügt, der ebenfalls Transkriptions-verstärkend wirkt. Trotzdem konnte mit den transformierten Konstrukten nur eine Akkumulation von 0,02% erreicht werden.

Chong & Langridge (2000) haben am Beispiel von humanem Lactoferrin verschiedene Promotoren direkt verglichen. Lactoferrin ist ein Eisen-bindendes Glykoprotein, das in hoher Konzentration in Milch von Säugetieren vorkommt und 80 kDa schwer ist. Das entsprechende Gen wurde entweder unter Kontrolle des Mas-Promotors oder aber des verstärkten 35S-Promotors gestellt. Die Western-Blot Analyse transgener Kartoffelknollen zeigte, daß mit dem induzierbaren Promotor transformierte Linien Lactoferrin bis zu 0,1%

TSP enthielten, Linien mit dem 35S-Promotor jedoch höchstens 0,01%. Im Gegensatz dazu konnte β -Casein unter Kontrolle des Mas-Promotors lediglich zu 0,01% in den Apoplasten von Kartoffelpflanzen exprimiert werden (Chong *et al.*, 1997).

An diesen Beispielen wird deutlich, daß die Verwendung eines starken Promotors in einigen Fällen zu einer erhöhten Expression führt, aber nicht allein ausschlaggebend für eine hohe Akkumulation ist.

Die Analyse der in den Pflanzen vorliegenden Transkript-Mengen im Northern-Blot zeigte, daß in 58-64% der LOX- bzw. 66-78% der TEL-Pflanzen mRNA der erwarteten Länge identifiziert wurde. Es wurden sowohl Linien mit hohen als auch mit niedrigen mRNA Mengen identifiziert. Erfahrungsgemäß kommen bei jeder Pflanzentransformation Linien mit nicht nachweisbaren, geringen und hohen mRNA-Mengen vor (Sijmons *et al.*, 1990; Mason *et al.*, 1992; Richter *et al.*, 2000). Diese Schwankungen der Transkriptmenge werden generell auf Positionseffekte zurückgeführt. Es gibt auch Beispiele, daß die Verwendung des verstärkten Promotors posttranskriptionale „Gene Silencing“-Effekte (PTGS) hervorrufen kann, wodurch die Menge der betroffenen mRNA-Moleküle beträchtlich verringert wird (Elmayan & Vaucheret, 1996; English *et al.*, 1996). Unter den in dieser Arbeit analysierten Transformanten mit plastidären Konstrukt war der Anteil der Linien mit wenig oder ohne Transkript jedoch im Vergleich zu den anderen Konstrukten nicht erhöht. Im Gegenteil, übereinstimmend mit der erhöhten Aktivität des verstärkten 35S-Promotors (Kay *et al.*, 1987), wiesen die Pflanzen mit plastidärem *sTEL*-Konstrukt durchschnittlich höhere mRNA-Mengen auf als die anderen LOX- und TEL-Linien.

Es könnte vermutet werden, daß Linien mit hohen Transkriptmengen auch deutlich mehr Protein anreichern, da sehr viele mRNA-Moleküle für die Translation zur Verfügung stehen. Zahlreiche Literaturbeispiele zeigen jedoch, daß ein Zusammenhang zwischen Transkript- und Proteinmengen nicht generell gegeben ist. Bei der Produktion von HSA in Tabakpflanzen wurde beobachtet, daß in den meisten Pflanzen mit hohen mRNA-Mengen auch mehr rekombinantes Protein vorliegt als in Pflanzen mit wenig Transkript (Sijmons *et al.*, 1990). Auch mit der Endoglucanase E1 (aus *Acidothermus cellulolyticus*) transformierte Kartoffelpflanzen zeigten eine positive Korrelation zwischen mRNA- und Protein-Mengen (Dai *et al.*, 2000a). Im Gegensatz dazu wurde bei der Überexpression des Hepatitis B Antigens in Tabakpflanzen beobachtet, daß gerade Pflanzen mit hohem mRNA-Gehalt nur wenig Protein exprimieren und umgekehrt (Mason & Arntzen, 1995). Entsprechende Beobachtungen machten Hensgens *et al.* (1992) nach Expression der β -Glucuronidase in Tabak. Auch bei endogenen pflanzlichen Proteinen korrelieren Transkript- und Proteinmenge nicht immer. So zeigen z.B. zwei verschiedene plastidäre G6PDH-Isoformen auf mRNA-

Ebene deutliche Unterschiede in den Transkriptmengen, obwohl die in den Zellen vorliegenden Proteinmengen vergleichbar sind (Wendt *et al.*, 2000).

Diese Daten verdeutlichen, daß nicht in jedem Fall davon ausgegangen werden kann, daß Linien mit hoher Transkriptmenge auch viel Protein akkumulieren und sich der mRNA-Gehalt in den transgenen Linien nicht als Auswahlkriterium eignet, um Pflanzen mit hoher Fremdgenexpression zu selektieren.

Die Proteinmenge scheint vielmehr noch von weiteren Faktoren, wie z.B. der Stabilität des betreffenden Proteins unter den herrschenden physiologischen Bedingungen beeinflusst zu sein.

Der Vergleich der publizierten Daten macht deutlich, daß die verwendete Pflanzenart und das untersuchte Gewebe ebenfalls Einfluß auf die Expressionshöhe haben kann. Einige Fremdproteine lassen sich in bestimmten Pflanzenarten in höheren Mengen produzieren als in anderen. Zum Beispiel enthielten Tabakpflanzen nach Expression von Lactoferrin bis zu 0,1% Fremdprotein (Salmon *et al.*, 1998). In Kartoffelknollen wurden dagegen Expressionshöhen von nur 0,01% erreicht (Chong & Langridge, 2000). Scheller *et al.* (2001) haben 5 verschiedene synthetische Proteine im ER von Tabak- und Kartoffelpflanzen exprimiert, die von der Sequenz eines Spinnfadenproteins von *Nephila clavipes* abgeleitet wurden. Anhand von Western-Blot Analysen wurden die Proteinmengen in Tabak- und Kartoffelpflanzen verglichen. In Tabakblättern akkumulierten alle Proteine bis zu 1 – 2% des TSP. In Knollen wurden für drei Proteine vergleichbare Expressionshöhen erreicht, die Ausbeuten bei den anderen beiden Proteinen lag jedoch 50% niedriger als in Tabakblättern. Die Expression der Endoglucanase E1 aus *Acidothermus cellulolyticus* in Tabak- und Kartoffelpflanzen zeigte hingegen eine umgekehrte Tendenz, wobei allerdings zu berücksichtigen ist, daß in diesem Fall nicht Kartoffelknollen sondern –blätter analysiert wurden. Die Expression wurde in beiden Versuchen durch den blattspezifischen Promotor RbcS-3C aus Tomate kontrolliert. In transgenen Tabakblättern wurde maximal 1,35% E1 im löslichen Protein, in den vergleichbaren Kartoffelblättern bis zu 2,6% E1 nachgewiesen (Dai *et al.*, 2000a + b).

Weiterhin hat sich gezeigt, daß Fremdproteine nicht in allen Kompartimenten einer Pflanzenzelle gleich gut hergestellt werden können, und daß, abhängig von den jeweiligen Proteineigenschaften, ein Kompartiment besser oder schlechter zur Expression geeignet ist. In den meisten Fällen werden der Apoplast, das ER oder die Plastiden für Expressionsversuche genutzt. Es gibt jedoch auch Daten über Expressionsstudien im Cytosol und in Vakuolen.

Ein direkter Vergleich von Apoplasten und Plastiden wurde mit der Endoglucanase E1 durchgeführt (Dai *et al.*, 2000a). Dabei wurden allerdings für die beiden Konstrukte unterschiedliche Promotoren benutzt, so daß die Ergebnisse nicht direkt verglichen werden

können. Im Plastiden macht E1 bis zu 2,6% des löslichen Gesamtproteins aus, wobei im Western-Blot zwei Banden markiert werden, von denen eine der erwarteten Größe von 75 kDa entspricht. Nach Sekretion in den Apoplasten werden hingegen höchstens 0,9% Fremdprotein akkumuliert und die im Western-Blot detektierte Bande von ca. 35 kDa macht deutlich, daß E1 auf dem Weg in oder im Apoplasten zu einem niedermolekularen Molekül degradiert wird.

Schillberg *et al.* (1999) haben mit der Produktion des IgG-Antikörpers rAb29 im Cytosol und Apoplasten der Zellen gezeigt, daß im Apoplasten der Tabakpflanzen bis zu 0,14% rAb29 angereichert werden, während im Cytosol die Expression unterhalb der Detektionsgrenze des verwendeten Antikörpers lag. Es wird also deutlich, daß bislang nicht vorhergesagt werden kann, in welchem Kompartiment sich ein Protein in größeren Ausbeuten produzieren läßt. Wenn posttranskriptionale Modifikationen die Lokalisation in einem bestimmten Kompartiment nicht notwendig machen, kann der geeignete Expressionsort nur empirisch ermittelt werden.

Die Expression von LOX und TEL in Pflanzen erfolgte in zwei unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten. Die Vakuole wurde nicht genutzt, weil der genaue Translokationsmechanismus sehr komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Unter anderem scheinen nicht nur das Signalpeptid, sondern auch Protein-interne Sequenzen und in der Tertiärstruktur enthaltene Signale die Lokalisation zu beeinflussen (Neuhaus, 1996; Müntz, 1998).

Als Zielkompartiment wurde in dieser Arbeit zum einen der Apoplast gewählt. Proteine erreichen den Apoplasten, indem sie in das Endomembran-System der Pflanzenzellen inseriert und bei Fehlen weiterer Signalsequenzen in den Apoplasten sekretiert werden. Das ER enthält zahlreiche universelle Chaperone wie die ATPase BiP (Muench *et al.*, 1997), Calreticulin (Michalak *et al.*, 1998) und Calnexin (Huang *et al.*, 1993), welche die korrekte Faltung sekretierter Proteine katalysieren und sowohl in tierischen als auch in pflanzlichen Organismen vorkommen. Weiterhin ist im ER die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) lokalisiert, die für die Bildung von Disulfidbrücken in Proteinen verantwortlich ist. Calreticulin und Calnexin binden ausschließlich glykosylierte Proteine (Bergeron *et al.*, 1994; Parodi, 1999). Es ist bekannt, daß im sekretorischen System eine Qualitätskontrolle neu synthetisierter Proteine erfolgt, die sicherstellt, daß nur korrekt gefaltete, assemblierte und modifizierte Proteine den sekretorischen Weg passieren können. Nicht-native Proteine werden zurückgehalten und der gezielten Degradation durch cytosolische Proteasomen zugeführt (Ellgaard *et al.*, 1999; Ellgaard & Helenius, 2001). Das Vorkommen ubiquitärer Chaperone könnte die Expression tierischer Proteine in Pflanzen erleichtern, da die Proteine auch im heterologen System richtig gefaltet und so vor Degradation geschützt werden.

Von Page & Angell (2001) wurde kürzlich beschrieben, daß die transiente Expression von GFP im ER, nicht aber im Cytosol von Tabakprotoplasten zur Aktivierung des pflanzlichen Abwehrmechanismus führt. Dadurch wird nochmals deutlich, daß Pflanzen Proteine als „fremd“ oder „falsch“ identifizieren können.

Pedrazzini *et al.* (1997) haben durch Expression des vakuolären Speicherproteins Phaseolin aus Bohne in Vakuolen von Tabakblättern gezeigt, daß die Deletion des C-Terminus die Stabilität des Proteins erniedrigt. Normalerweise wird Phaseolin als Trimer transportiert, wobei der Kontakt der Moleküle untereinander über den C-Terminus erfolgt. Wird die Bildung des Multimers durch die Deletion gestört, verringert dies die Stabilität der Moleküle. Gleichzeitig wurde beobachtet, daß BiP an die Deletionsmutante bindet und mit einer ähnlichen Kinetik degradiert wird. Chaperone spielen nicht nur bei der Faltung von Proteinen, sondern auch bei der Degradation fehlerhafter Moleküle eine Rolle.

Ein anderes humanes Faserprotein, Prokollagen des Typs $\alpha 1(I)$, konnte erfolgreich im Apoplasten von Tabakpflanzen zu 0,3% des Gesamtproteins produziert werden (Ruggiero *et al.*, 2000).

Zum anderen wurde das Plastiden-Stroma als Zielkompartiment ausgesucht. Weder LOX noch TEL enthalten ER-spezifische posttranslationale Modifikationen wie Disulfidbrücken, die für die biologische Funktion essentiell sind und eine Insertion in das Endomembran-System obligatorisch machen. In Plastiden konnte von de Cosa *et al.* (2001) durch direkte Transformation des Plastidengenoms eine Akkumulation des Proteins cryIIA von 47% des löslichen Proteins erreicht werden. Bei cryIIA handelt es sich um ein Insektentoxin aus *Bacillus thuringiensis*, das bei Verzehr tödlich auf Lepidopteren und Dipteren wirkt und als Fraßschutz für die Pflanzen dienen soll.

Dieses Beispiel zeigt, daß Plastiden in der Lage sind, große Fremdproteinmengen einzulagern, ohne in ihrer Physiologie gestört zu werden. Da die Technik der direkten Transformation nicht zur Verfügung stand, wurden LOX und TEL durch Fusion eines plastidären Signalpeptids posttranslational in die Plastiden importiert.

TEL konnte mit den hergestellten Konstrukten erfolgreich in den Plastiden exprimiert werden, wogegen die Expression im Apoplasten zu keiner nachweisbaren Fremdproteinakkumulation führte. Die Frage, ob der Apoplast für die Expression von TEL generell schlechter geeignet ist als Plastiden, kann aber nicht abschließend beantwortet werden, da für das sekretorische Konstrukt der einfache 35S-Promotor, für das plastidäre Konstrukt jedoch die verstärkte Variante eingesetzt wurde.

Für LOX können keine abschließenden Aussagen über die stabile Expression des Proteins in Pflanzen gemacht werden. Erst durch die transienten Tests mit verschiedenen LOX-GFP-Fusionsproteinen wurde deutlich, daß LOX in Plastiden nur als Vorläuferprotein exprimiert werden kann. Selbst mit Propeptid war die Expression in den Plastiden der Protoplasten jedoch so gering, daß die Grünfluoreszenz nur sehr schwach zu erkennen war.

In allen Vertebraten wird LOX als Vorläuferprotein exprimiert. LOX wird als 50 kDa schweres Proenzym sekretiert und durch proteolytische Spaltung in die reife 31 kDa Form überführt (Smith-Mungo & Kagan, 1998). Die Prozessierung der LOX erfolgt durch die Metalloproteinase BMP-1 (bone morphogenetic protein-1) im extrazellulären Raum. Diese Proteinase kommt lediglich im tierischen Organismen vor (Ouzzine *et al.*, 1996) und steht deshalb für die Prozessierung des Proenzym in transgenen Pflanzen nicht zur Verfügung.

LOX wird außerdem in allen Vertebraten im Bereich des Propeptids N-glykosyliert (Trackman *et al.*, 1992). Es ist beschrieben, daß einige Proteine erst nach N-Glykosylierung stabil im ER vorliegen und die vorzeitige Denaturierung oder Proteolyse auf diese Weise verhindert wird (Elbein, 1991). Da BMP-1 in pflanzlichen Organismen nicht vorkommt und aus diesem Grund angenommen werden mußte, daß das Proenzym nicht korrekt prozessiert werden kann, wurde in dieser Arbeit zur stabilen Transformation ausschließlich die Sequenz des reifen Proteinbereichs verwendet.

Ruggiero *et al.* (2000) konnten später erstaunlicherweise zeigen, daß nach Expression von Prokollagen in Tabakpflanzen das Propeptid, welches im Extrazellularraum durch dieselbe Protease prozessiert wird, an der korrekten Stelle gespalten wird. Es wird angenommen, daß die Prozessierung durch eine pflanzenspezifische Protease erfolgt, die eine ähnliche Spezifität wie BMP-1 aufweist. Da die transienten Tests in dieser Arbeit gezeigt haben, daß LOX ausschließlich als Vorläuferenzym in Pflanzenzellen exprimierbar ist, sollten aufgrund der von Ruggiero *et al.* (2000) veröffentlichten Daten neue LOX-Konstrukte mit Propeptid transformiert werden. Es ist davon auszugehen, daß das Propeptid und die damit verbundene N-Glykosylierung stabilisierend auf die Konformation der LOX wirkt und eine vorzeitige Degradation verhindert. Durch die N-Glykosylierung könnte z.B. eine Interaktion mit den ER-residenten Chaperonen Calreticulin und Calnexin erfolgen, die maßgeblich an der Faltung glykosylierter Proteine beteiligt sind, so daß das Vorläuferenzym korrekt gefaltet und der Transport ermöglicht wird.

Es gibt allerdings auch Untersuchungen, die belegen, daß fehlende Glykosylierung nicht zwingend die Degradation eines Proteins verursachen muß. Von Voelker *et al.* (1989) wurden die Glykosylierungsstellen des vakuolären Proteins Phytohämagglutinin durch Mutagenese entfernt. Das Protein lag auch im unglykosylierten Zustand stabil im ER vor und wurde korrekt in die Speichervakuolen transportiert.

5.2 Überexpression der synthetischen Gene in *Pichia pastoris* und *Escherichia coli*

TEL und LOX wurden rekombinant im Hefe- und Bakterien-System hergestellt, um Positivkontrollen zur Verfügung zu haben und um Nachweissysteme für die Pflanzenanalysen etablieren zu können. Gleichzeitig konnte durch erfolgreiche Proteinsynthese nachgewiesen werden, daß die synthetisch hergestellten Gene transkribierbar und translatierbar sind.

Als Expressionssysteme wurden *Pichia pastoris* und *Escherichia coli* ausgewählt. Die Expression der Fremdgene in *E. coli* wurde mit dem Strep-Tag-System durchgeführt, da durch die Fusion des Strep-Tags die Affinitätsreinigung des Fremdproteins ermöglicht wird. Bisher konnten zahlreiche Proteine mit diesem System synthetisiert und gereinigt werden. Beispielsweise wurde die plastidäre Isoform der Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase aus Kartoffel in enzymatisch aktiver Form synthetisiert und durch Strep-Tag-Affinitätschromatographie rein dargestellt. Dieses ist zuvor weder mit klassischen Reinigungsmethoden noch durch Affinitätschromatographie mit anderen Reinigungs-Tags gelungen (Wenderoth *et al.*, 1997; Wendt *et al.*, 2000).

Da die Expressionshöhen von den Eigenschaften des jeweiligen Proteins abhängen und nicht alle Expressionssysteme zu einer erfolgreichen Akkumulation des heterologen Proteins führen, wurden *sLOX* und *sTEL* parallel in *Pichia pastoris* exprimiert. In dieser methylo trophen Hefe können heterologe Proteine intra- und extrazellulär produziert werden. Die meisten Fremdproteine konnten in Konzentrationen von 0,5-4 g/l Kultur hergestellt werden (Übersicht in Cregg *et al.*, 1993). Generell werden heterologe Proteine intrazellulär stärker exprimiert als bei Sekretion ins Medium. Fragment C des Tetanustoxins wurde zum Beispiel intrazellulär in einer Menge von 12 g/l Kultur hergestellt (Clare *et al.*, 1991). Der Vorteil der extrazellulären Expression ist jedoch die geringere Verunreinigung des Kulturüberstandes mit Hefe-Proteinen, da die Zellen nur wenige Proteine sekretieren, was die nachfolgende Aufreinigung vereinfacht.

Zur Expression wurde die synthetisch hergestellten *LOX*- und *TEL*-Sequenzen verwendet.

5.2.1 *Pichia pastoris*

Um die jeweils optimalen Bedingungen für die Expression beider Proteine zu finden, wurden die synthetischen Gene intra- und extrazellulär in den Stämmen X-33 und KM71H exprimiert. X-33 wächst auf Medien mit Methanol als einziger Kohlenstoffquelle deutlich schneller als KM71H. Es wurde beschrieben, daß sich oft nur einer dieser Stämme zur Expression eignet, wobei nicht begründet werden kann, woran dies liegt. Bis heute kann nur empirisch ermittelt

werden, welcher Stamm produktiver ist (Rosenfeld, 1999). Daher wurden in dieser Arbeit generell beide getestet.

Da die Expressionsstärke im *Pichia*-System unter anderem vom Rekombinationsort des Fremdgens ins Genom abhängig ist, wurden jeweils 10 unabhängige Klone auf Expression getestet. LOX wurde in KM71H intrazellulär in geringen Mengen hergestellt, nicht aber nach Sekretion ins Medium. TEL konnte unter keiner der gewählten Bedingungen nachgewiesen werden. Eventuell ist die Aminosäurezusammensetzung des Proteins für die Hefezellen problematisch, da wegen des hohen Vorkommens von Glycin, Prolin, Alanin und Valin diese Aminosäuren nur limitiert zur Verfügung stehen.

Auffällig ist, daß sowohl LOX als auch TEL nicht extrazellulär exprimiert werden konnten, obwohl beide in tierischen Zellen das sekretorische System durchlaufen. Um sicherzugehen, daß nicht ein unvollständiger Export aus den Zellen den Nachweis von Protein im Medium verhindert, wurden zusätzlich die sedimentierten Zellen aufgeschlossen und analysiert. Aber auch hier konnte kein Fremdprotein nachgewiesen werden. Eine Ursache für die fehlende Akkumulation der Fremdproteine könnte ein schneller Abbau im ER sein, wo unter anderem die Qualitätsprüfung neu synthetisierter Proteine stattfindet. Analog zu Pflanzen werden falsch gefaltete Proteine auch in Hefen aus dem ER transportiert und im Cytosol degradiert (Hill & Cooper, 2000). Alternativ ist denkbar, daß die Stabilität des Enzyms durch die starke Verdünnung im Medium beeinträchtigt wird.

Da LOX intrazellulär im mut^S-Stamm KM71H in geringen Mengen exprimiert werden konnte, wurden Optimierungsversuche durchgeführt, um die Ausbeute zu erhöhen. Häufig kann durch Erhöhung des Kulturvolumens eine deutlich höhere Proteinausbeute erreicht werden, wenn geringe Mengen des Fremdproteins unter den Standard-Bedingungen exprimiert werden (Firmeninformation Invitrogen). Im Falle der LOX wurde die Expressionsrate durch Erhöhung des Kulturvolumens (10fach) geringfügig gesteigert, jedoch nicht signifikant erhöht. Ein Grund für die geringe Expression könnte die Störung des Stoffwechsels der Hefezellen durch die enzymatische Aktivität der LOX sein, da LOX als reifes Protein exprimiert wurde. Daher ist es denkbar, daß ein Überschreiten einer gewissen LOX-Konzentration von den Hefezellen nicht toleriert wird und das Protein verstärkt abgebaut wird. Diese Hypothese ließe sich durch Expression der LOX mit Propeptid in Hefezellen überprüfen. Sollten in diesem Versuchsansatz höhere Fremdproteinausbeuten erreicht werden, wäre dies ein Hinweis darauf, daß LOX nur als inaktives Vorläuferprotein Transportkompatibel ist und das sekretorische System passieren kann.

5.2.2 *Escherichia coli*

Parallel zu den Hefe-Expressionsversuchen wurden beide Proteine in *E. coli* unter Verwendung des Strep-Tag Systems exprimiert, das eine Affinitätsreinigung des rekombinanten Proteins über den fusionierten Tag ermöglicht.

Mit diesem Expressionssystem konnte LOX in dieser Arbeit in *E. coli* hergestellt werden. Zunächst wurde die Expression im Stamm XL1-Blue getestet. In diesem Bakterienstamm war nach Induktion ein deutlich verlangsamtes Wachstum der Zellen im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle zu beobachten. Dies läßt vermuten, daß LOX für diesen Stamm toxisch ist und wahrscheinlich in enzymatisch aktiver Form exprimiert wird.

Im Gegensatz dazu war die Expression im Stamm BL21 erfolgreich. Bei Verwendung eines Konstrukts zur cytosolischen Expression war eine deutliche Bande nachweisbar und nach Reduktion der Anzucht-Temperatur auf 28°C lagen nur ca. 50% des rekombinanten Proteins in Einschußkörpern vor. Die produzierte lösliche LOX-Menge wurde auf 1 mg/l Kultur im Western-Blot abgeschätzt. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Ouzzine *et al.* (1996), die LOX unter Verwendung des pET-Expressionssystems im Cytoplasma *E. coli*-Stamm BL21 erfolgreich exprimieren konnten. Zusätzlich gelang hier auch die Expression im Periplasma, was in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte.

Im Gegensatz zu XL1-Blue war in BL21 das Wachstum der Zellen nach der Induktion nicht eingeschränkt, wodurch in diesem Stamm deutlich höhere Proteinmengen produziert werden konnten. Der Grund für diesen Unterschied könnte in den genotypischen Variationen der verwendeten Stämme liegen. BL21 gehört zu den *E. coli* B-Stämmen, denen die Lon-Protease fehlt. Dieses endoproteolytische Enzym kommt in großen Mengen in *E. coli* vor und zerstört unter ATP-Hydrolyse falsch gefaltete oder denaturierte Proteine in der Zelle. Es wird vermutet, daß die Lon-Protease bei der Streßantwort von *E. coli* Zellen eine Rolle spielt (Phillips *et al.*, 1984). Bei Expression in enzymatisch aktiver Form könnte LOX mit wirtseigenen Proteinen reagieren, wobei durch Oxidation von Lysinresten H₂O₂ entsteht. Durch Einleitung der Streßantwort muß dieses nachfolgend detoxifiziert werden, damit die Zellen keinen Schaden nehmen. In BL21 würde diese Antwort unterbleiben und die Zellen wären kurzfristig in der Lage, mehr Fremdprotein anzureichern. Die Annahme, daß LOX durch die Lon-Protease zerstört wird, wird noch durch die Beobachtung unterstützt, daß in XL1-Blue bei 30°C noch geringe LOX-Mengen, bei 37°C hingegen gar kein Protein nachweisbar ist. Die Synthese der Lon-Protease wird nämlich bei höheren Temperaturen begünstigt (Phillips *et al.*, 1984).

Da LOX in BL21 erfolgreich löslich produziert werden konnte, wurden mit dem ungereinigten Bakterienextrakt Aktivitätsmessungen durchgeführt. Es sollte getestet werden, ob der enzymatische Test im Vergleich zum immunologischen Nachweissystem sensitiver und evtl.

für ein Screening aller transgenen LOX-Pflanzen zu verwenden ist, die im Western-Blot negativ getestet wurden. Aufgrund der gerätetechnischen Möglichkeiten wurde nicht der standardmäßig durchgeführte radioaktive Test von Fornieri *et al.* (1987), sondern ein alternativer nicht-radioaktiver Test eingesetzt. Die Substratspezifität der LOX ist nicht besonders ausgeprägt, was sich schon anhand der Strukturunterschiede von Kollagen und Tropoelastin ableiten läßt, die beide als Substrat genutzt werden. Isolierte LOX aus Rind oxidiert Peptidyl-Lysine in mehreren basischen, globulären Proteine (Kagan *et al.*, 1984). Ebenso können durch LOX auch einfache Monoamine und Diamine desaminiert werden, wobei jedoch nach ca. 300 Reaktionen das Enzym irreversibel geschädigt wird (Trackman & Kagan, 1979). Im nicht-radioaktiven Enzymtest kommt als Substrat Diaminopentan zum Einsatz, welches LOX unter H_2O_2 -Bildung desaminiert. Das H_2O_2 kann wiederum durch eine gekoppelte Peroxidasereaktion zur Oxidation von Homovanillat genutzt werden, das dadurch zum fluorimetrisch nachweisbaren Produkt konvertiert wird (Trackman *et al.*, 1981). Für den beschriebenen Test werden laut Literatur 2 – 4 µg reines Enzym benötigt.

In den Test konnten maximal 50 µl Proteinextrakt eingesetzt werden, so daß ca. 0,5 µg LOX pro Test zur Verfügung standen. Die in BL21 exprimierten LOX-Mengen reichten nicht aus, um einen Konzentrationsanstieg von oxidiertem Homovanillat zu detektieren. Es kann daher nicht gesagt werden, ob in den Bakterien aktives Enzym produziert werden konnte. Durch die großen benötigten Enzymmengen ist der Test für Aktivitätsmessungen im Pflanzenextrakt nicht geeignet, da erst Expressionshöhen ab 1-2% des TSP detektierbar wären.

Die Expression von TEL mit Hilfe des Strep-Tag Expressionssystems wurde ebenfalls in den Stämmen BL21 und XL1-Blue getestet. Zusätzlich zu der cytosolischen Expression von TEL wurde noch ein Konstrukt zur periplasmatischen Expression angefertigt, da dieses Kompartiment zur Herstellung von TEL bisher von keiner Arbeitsgruppe getestet wurde.

Die cytosolische Synthese von TEL führte in XL1-Blue und BL21 bei 30°C zu guten Expressionsraten. In der Annahme, daß aufgrund der Aminosäurekombination für die Synthese des Proteins nicht ausreichend Aminosäuren zur Verfügung stehen, wurden den Kulturen Aminosäuren zugesetzt. Dadurch konnte die produzierte Proteinmenge jedoch nicht erhöht werden, so daß das Aminosäuren-Angebot offenbar nicht limitierend ist.

Erfolgte die Inkubation der Expressionskulturen bei 37°C, lag in beiden Stämmen ungefähr 50% des rekombinanten Proteins in Einschlußkörpern vor. Durch Erniedrigung der Anzucht-Temperatur auf 30°C konnte das gesamte TEL löslich synthetisiert werden. Im Western-Blot wurde ein Expressionsmenge von ca. 0,5 mg/l Kultur abgeschätzt, Degradationsprodukte wurden hierbei nicht berücksichtigt. Daß die Bildung von Einschlußkörpern durch Erniedrigung der Anzucht-Temperatur zu reduzieren ist, wurde schon von Makrides (1996)

beschrieben. Eine hohe Syntheserate von rekombinanten Proteinen in *E. coli* führt häufig zur Entstehung von Einschußkörpern, deren Bildung offenbar unabhängig von den biochemischen Eigenschaften der Proteine sind (Wilkinson & Harrison, 1991). In Einschußkörpern sind neben dem Fremdprotein noch Wirtsproteine (RNA-Polymerase, Elongationsfaktoren, Proteine der äußeren Membranen, kleine Hitzeschockproteine), Plasmid-DNA und rRNA enthalten (Hart *et al.*, 1990).

Periplasmatisch konnte TEL in Bakterien nicht exprimiert werden. Wie schon für LOX beschrieben, führte auch hier die Induktion des Promotors zur Stagnation des Zellwachstums. Grund hierfür könnten die ausgedehnten hydrophoben Bereiche im Tropoelastin-Molekül sein, die den Transport über die Membran erschweren und dadurch die Vitalität der Bakterien beeinträchtigen.

Cytosolisch wurde TEL in *E. coli* bereits von anderen Arbeitsgruppen überexprimiert, die aber Probleme bei der Reproduzierbarkeit ihrer Ergebnisse hatten und weder den Expressionsstamm noch angereicherte Proben zur Verfügung stellen wollten. Indik *et al.* (1990) haben TEL allein und in C-terminaler Fusion mit dem NS1-Protein des Influenza Virus hergestellt. Die Zellen wurden bei den beschriebenen Versuchen bei 37°C angezogen und nach der Induktion für weitere 6-7 h bei dieser Temperatur inkubiert. Dabei fiel auf, daß das Fusionsprotein in beachtlichen Mengen produziert werden konnte, während TEL ohne NS1 bereits während der Synthese in den Zellen abgebaut wurde. Es zeigte sich, daß NS1:TEL in der unlöslichen Membranfraktion zu finden war, vermutlich, weil das Protein Interaktionen mit den Membranen eingeht. Nach Abspaltung von NS1 durch Bromzyanbehandlung wurde die TEL-Ausbeute auf 2-4 mg/l Kultur geschätzt.

Im Widerspruch zu Indik *et al.* (1990) und eigenen Ergebnissen stehen die Expressionsdaten von Martin *et al.* (1995). Die Bildung von Einschußkörpern oder die Degradation von TEL nach Expression in BL21 wurde in diesem Fall nicht beschrieben. Hier konnte nach Herstellung des synthetischen *TEL*-Gens und Anpassung der „Codon Usage“ an *E. coli* bis zu 30 mg TEL pro Liter Kultur produziert werden.

Die N-terminale Fusion des Strep-Tag ermöglicht die Reinigung des Proteins über Strep-Tactin-Sepharose. Es konnte gezeigt werden, daß das rekombinante Protein unter Standardbedingungen vollständig an die Matrix bindet. Die Reinigungsfractionen waren jedoch noch stark mit Wirts-Proteinen kontaminiert. Da die Waschfractionen jedoch nahezu proteinfrei waren, muß postuliert werden, daß diese Wirtsproteine entweder unspezifisch an die Matrix binden oder aber mit TEL eine Bindung eingehen. Bei der Reinigung einer G6PDH-Isoform wurde mit demselben Expressionssystem gearbeitet (Diplomarbeit U. Wendt, 1998). Sowohl der Vektor als auch der zur Überexpression verwendete *E. coli*-Stamm und die Puffer waren identisch. Da die Größen der dort beschriebenen

Kontaminationen in den Elutionsfraktionen nicht den in dieser Arbeit beobachteten entsprechen (siehe Kapitel 4.2.2.2.5), kann vermutet werden, daß die Verunreinigungen auf Interaktionen von TEL mit Wirtsproteinen zurückzuführen sind. Da im Western-Blot nur eine Bande bei 62 kDa markiert wird, kann ausgeschlossen werden, daß es sich bei den zusätzlichen Banden um Degradationsprodukte handelt.

Tropoelastin konnte durch Affinitätschromatographie angereichert, aber nicht rein dargestellt werden. Nach Abschätzen der Bandenstärke im Western-Blot konnte TEL etwa um den Faktor 50 angereichert werden.

Bereits bei den Expressionsversuchen in XL1-Blue fiel auf, daß TEL nicht besonders stabil ist und im Western-Blot Degradationsbanden zu erkennen sind. Im Western-Blot wurden mit Strep-Tactin-AP Konjugat Banden detektiert, die kleiner als das vollständige Protein waren. Da nicht-induzierte Proben nach Entwicklung mit diesem Konjugat keinerlei Hintergrund zeigten, mußte es sich bei diesen Banden um Degradationsprodukte von TEL handeln, die am N-Terminus noch den Strep-Tag tragen. Es ist bekannt, daß TEL Interaktionen mit anderen Proteinen eingehen kann und daß bei der Reinigung des Proteins aus Vertebraten eine Trypsin-ähnliche Protease mit aufgereinigt wird, die TEL in kleinere Peptide zerlegt (Mecham *et al.*, 1977).

Das Auftreten der Degradationsbanden konnte auch durch Zugabe von Proteaseinhibitoren beim Aufschluß nicht verhindert werden. Der Abbau findet offensichtlich bereits in den Bakterienzellen statt, was die Versuche von Indik *et al.* (1990) ebenfalls belegen. Nach Reinigung von TEL sind die Abbaubanden in den Reinigungsfractionen nicht mehr zu detektieren, so daß vermutet wird, daß die Abbauprodukte schnell weiter degradiert werden oder unterhalb der Detektionsgrenze liegen. Zudem wurde beobachtet, daß das Verschwinden von TEL im angereinigten Extrakt mit 1 h Verzögerung eintritt. Im ungereinigten Extrakt werden im Zeitverlauf die Abbaubanden immer stärker und teilen sich in immer kleinere Produkte auf. Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß für die Instabilität des TEL mehrere Faktoren verantwortlich sind. Zum einen scheinen verschiedene Proteasen im Rohextrakt, die z.T. nach der Affinitäts-Chromatographie abgetrennt sind, die Instabilität des Proteins zu begünstigen. Da TEL aber auch nach der Anreinigung verschwindet, könnten noch andere, mit aufgereinigte Proteasen den Abbau fördern.

Bei den Reinigungsversuchen fiel auf, daß bereits nach wenigen Stunden kaum noch TEL im Western-Blot nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grund wurde die Stabilität der angereicherten Proteinpräparation bei Raumtemperatur untersucht. Es zeigte sich, daß das Protein bereits nach 3 h fast vollständig verschwunden war und keine Degradationsbanden nachgewiesen werden konnten. Die Zugabe von einem Gemisch von Proteaseinhibitoren-Gemisch (Inhibition von Serin-, Cystein-, Aspartat-, Metalloproteasen und Amino-peptidasen)

während der Inkubation führte nur bei 4°C zu einer deutlichen Verlangsamung der Degradation. Bei Raumtemperatur waren nur minimale Unterschiede zur Probe ohne Proteaseinhibitoren zu sehen, so daß davon auszugehen ist, daß bei zunehmender Temperatur die Proteasen nicht mehr vollständig durch die Inhibitoren inaktiviert werden können.

Da das Verschwinden des Proteins außerdem in Glasgefäßen noch schneller verlief als in Kunststoff- oder Teflon-beschichteten Gefäßen, wird weiterhin vermutet, daß TEL durch Wechselwirkungen mit der Gefäßoberfläche aus der Lösung entfernt wird. Auch die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in den Gefäßen mit Milchpulver konnte das Verschwinden von TEL nicht verhindern oder verlangsamen. Das Protein bindet dabei so fest an die Gefäßwand, daß es auch durch Denaturierung nicht wieder in Lösung zu bringen ist.

Eine physiologisch sinnvolle Erklärung für die Instabilität von TEL findet sich beim Blick auf die Vorgänge bei der Synthese elastischer Fasern. TEL wird sekretiert und im ER an das Protein EBP („elastin binding protein“) gebunden, das als Chaperon während des Transports fungiert. An der Zelloberfläche wird die Affinität der Bindung durch einen an EBP bindenden Galaktose, der Bestandteil der Mikrofibrillen ist, erniedrigt und das freie TEL sofort in die wachsende elastische Faser eingebaut (DeBelle & Tamburro, 1999; Hinek & Rabinovitch, 1994). In Organismen mit funktioneller LOX kann freies TEL nicht isoliert werden, was darauf hindeutet, daß freie TEL-Moleküle schnell und effizient zu Elastin verknüpft und nicht-funktionelle Moleküle rasch degradiert werden. EBP bindet an das Motiv VGVAPG, das ebenfalls als Bindestelle von Serin-Proteasen dient (Hinek & Rabinovitch, 1994). Durch die Bindung von EBP wird also vermutlich die Degradation von TEL während der Sekretion durch Maskierung der Protease-Angriffsstellen verhindert. Zudem wird durch EBP die vorzeitige Aggregation der TEL-Moleküle über die hydrophoben Bereiche unterbunden. Es wurde gezeigt, daß nicht-funktionelles EBP die Bildung von elastischen Fasern stört (Hinek *et al.*, 1991). Es ist naheliegend, daß die beobachtete Instabilität von TEL ein natürlicher Sicherungsmechanismus ist, der den Einbau fehlerhafter oder nicht an EBP-gebundener TEL-Moleküle ausschließt. Da elastische Fasern ein Leben lang halten und nicht erneuert werden, kontrolliert dieser Mechanismus die Bildung korrekter elastischer Fasern, so daß nur strukturell intakte Moleküle in die Fasern eingebaut werden können. Welche Mechanismen bei der Degradation von TEL eine Rolle spielen, konnte nicht abschließend festgestellt werden. Es ist aber offensichtlich, daß das verwendete Protein so instabil ist, daß es sich in dieser Form nicht zur Produktion eignet.

Die Versuche haben gezeigt, daß TEL und LOX mit dem Strep-Tag Expressionssystem produziert werden können. Mit der Hefe *Pichia pastoris* konnte keines der beiden Proteine in nennenswerten Mengen hergestellt werden.

Die rekombinanten Proteine ermöglichten die Etablierung der Detektionssysteme für die Pflanzentests und die Überprüfung der spezifischen Antikörper auf ihre Funktion und Sensitivität. TEL konnte außerdem über Affinitätschromatographie angereichert und für Versuche zum Degradationsverhalten des Proteins verwendet werden.

5.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, daß prinzipiell sowohl LOX als auch TEL in Pflanzenzellen produzierbar sind. Die Ergebnisse haben aber auch deutlich gemacht, daß noch eine Reihe weiterer Versuche notwendig sind, damit in Kartoffelpflanzen beide Proteine in relevanten Mengen exprimiert werden können. Aufgrund der verwendeten Nachweissysteme konnten Expressionsmengen unter 0,05% des löslichen Gesamtproteins nicht detektiert werden, so daß es sinnvoll erscheint, neue Antikörper mit einer erhöhten Spezifität zu generieren. Auf diese Weise könnten auch Expressionsmengen unter 0,05% detektiert werden, die bei humanen Proteinen häufig vorkommen.

Für die wirtschaftlich lohnende Produktion eines Proteins in Pflanzen sollte das Fremdprotein mindestens 1% des löslichen Proteins ausmachen, wenn das Protein nach der Anzucht aus dem Pflanzenextrakt gereinigt werden muß (Kusnadi, 1997). Die Expression von plastidär lokalisiertem TEL müßte also im Vergleich zum bestehenden System mindestens um den Faktor 20 erhöht werden.

Das größte Problem bei der heterologen Expression von TEL ist die beobachtete Instabilität, die auf jeden Fall überwunden werden muß, um eine lohnende Produktion zu gewährleisten. Ein Lösungsansatz wäre z.B. die Co-Expression mit dem Chaperon EBP, das durch Maskierung der Proteasespaltstellen die Degradation verhindern könnte. Nach Reinigung des Protein-Protein-Komplexes kann dann durch Zugabe eines Galaktosezuckers TEL freigesetzt werden.

Falls die Co-Expression von EBP die Degradation der TEL-Moleküle nicht verhindern kann, ist weiterhin die Entfernung von Protease-Erkennungsstellen aus der Sequenz denkbar. Hier müßten jedoch zunächst die Protease-Schnittstellen identifiziert und in diesen Regionen zufällige Aminosäureaustausche eingefügt werden. Die einzelnen Mutanten könnten in *E. coli* exprimiert und auf ihre Stabilität untersucht werden. Daß Proteasespaltstellen eliminiert werden können, wurde bereits von Lassen *et al.* (1992) gezeigt. Diese Arbeitsgruppe hat einen Aminosäureaustausch in dem Protein IF2 („initiation factor 2“) aus *E. coli* durchgeführt. IF2 wurde bei Zellaufschluß durch die ompT-Protease partiell degradiert. Durch den Aminosäuretausch konnte diese Spaltstelle eliminiert werden. Es

zeigte sich jedoch, daß durch die Sequenzveränderung der präferierten Spaltstelle in IF2 eine Spaltung an anderer Stelle durch die gleiche Protease resultierte.

Mit einem veränderten synthetischen *TEL*-Gen können anschließend Versuche zur Expressionssteigerung durchgeführt werden. Einen wichtigen Einfluß auf die Expressionsstärke hat zunächst der Promotor. In dieser Arbeit wurde für *TEL* festgestellt, daß die Verwendung des verstärkten 35S-Promotors zu höheren mRNA Mengen führt als der Einsatz des einfachen Promotors. Aus diesem Grund wäre es denkbar, zunächst auch das sekretierte *TEL*-Konstrukt unter die transkriptionale Kontrolle dieses Promotors zu stellen. Parallel dazu können weitere konstitutive, induzierbare oder auch organspezifische Promotoren getestet werden.

Zudem sollte experimentell der optimale Expressionsort ermittelt werden. Die einzelnen Zellkompartimente unterscheiden sich in ihren physiologischen Bedingungen wie pH-Wert, Redoxpotential oder der Chaperonausstattung, welche unter Umständen die Stabilität der exprimierten Fremdproteine positiv beeinflussen können. In transienten Tests können verschiedene Kompartimente vorgetestet werden. Lediglich die Expression im Apoplast ist schwierig zu untersuchen, da sekretierte Proteine im Medium häufig nicht nachweisbar sind (diese Arbeit, di Sansebastiano *et al.*, 1998).

Die transienten Tests mit LOX haben gezeigt, daß die Expression des Proteins in Pflanzen nur inklusive N-terminal fusioniertem Propeptid möglich ist. Aus diesem Grund sollten neue Konstrukte angefertigt werden, in denen auch im Propeptid die „Codon Usage“ angepaßt ist, da 64% der Sequenz aus Guanin und Cytosin bestehen. Das neue Konstrukt könnte zur Expression in verschiedenen subzellulären Kompartimenten verwendet werden, um den optimalen Expressionsort zu finden. Da dieses Enzym im aktiven Zustand exprimiert werden soll, ist entweder die Etablierung eines in Pflanzenrohextrakten funktionierenden Enzymtests oder die Entwicklung eines Reinigungsprotokolls essentiell.

Mit der vorliegenden Arbeit ist die Grundlage für die Entwicklung eines Produktionssystems gelegt worden, um sowohl LOX als auch *TEL* erfolgreich in Kartoffelpflanzen zu exprimieren. Die aufgeführten Überlegungen zur Weiterentwicklung des Systems sind als Denkansätze zur Überwindung der in dieser Arbeit aufgetretenen Expressionsprobleme zu verstehen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die humanen Proteine Tropoelastin und Lysinoxidase werden zur *in vitro* Herstellung des elastischen Polymers Elastin benötigt. Zur Expression beider Proteine in Kartoffelpflanzen wurden in dieser Arbeit die humanen Sequenzen an die „Codon Usage“ der Pflanzen angepaßt und die synthetischen Gene stabil transformiert. Für die Expression in Pflanzenzellen wurden je Protein zwei subzelluläre Kompartimente getestet, die Plastiden und der Apoplast.

In zwei Linien konnte plastidär lokalisiertes Tropoelastin in einer Menge von ca. 0,05% des löslichen Gesamtproteins nachgewiesen werden. In den Pflanzenlinien, die Tropoelastin in den Apoplasten sekretierten, lag die Expression des Fremdproteins unterhalb der Nachweisgrenze des Antikörpers.

Eine Expression der Lysinoxidase konnte weder in den Plastiden noch im Apoplasten der transgenen Kartoffelpflanzen beobachtet werden.

Parallel zu den stabilen Transformationsversuchen wurden sowohl für Tropoelastin als auch für Lysinoxidase GFP-Fusionsproteine hergestellt und transient in Tabakprotoplasten exprimiert. Für Lysinoxidase zeigte sich, daß dieses Protein im Pflanzensystem ausschließlich als Vorläuferprotein mit N-terminal fusioniertem Propeptid und nicht im reifen Zustand hergestellt werden kann. Die Expression des reifen Enzyms in Fusion mit GFP führte zu nicht nachweisbaren Expressionsmengen.

Versuche mit plastidär lokalisierten GFP-Fusionsproteinen in Tabakprotoplasten zeigten zusätzlich, daß TEL:GFP in Tabakprotoplasten exprimiert wird und das Fusionsprotein sowohl fluoreszierte als auch im Sandwich-ELISA nachweisbar war.

Tropoelastin kann also in Pflanzenzellen hergestellt werden. Aufgrund der beobachteten Instabilität des Proteins kann jedoch keine hohe Akkumulation in den Pflanzen erreicht werden.

Gleichzeitig wurden beide Proteine in reifer Form in Bakterien- und Hefezellen hergestellt, um die für die Pflanzentests notwendigen Nachweissysteme entwickeln zu können.

In *E. coli* ließ sich Tropoelastin im Cytosol in löslichen Mengen von ungefähr 0,5 mg/l Kultur produzieren. Über den fusionierten Strep-Tag konnte Tropoelastin durch Affinitätschromatographie um Faktor 50 angereichert werden. Stabilitätsversuche zeigten, daß TEL schon während der Synthese in den Bakterienzellen degradiert wird. In *Pichia pastoris* konnte Tropoelastin weder intra- noch extrazellulär hergestellt werden.

LOX konnte in Hefe- und Bakterienzellen intrazellulär bis zu einer Konzentration von ca. 1 mg/l Kultur hergestellt werden.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungen

2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetat
AHT	Anhydrotetrazyklin
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
BAP	6-Benzylaminopurin (Cytokinin)
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat
BL21	<i>E. coli</i> -Stamm BL21
bp (kb)	Basenpaare (Kilobasenpaare)
BSA	Rinderserumalbumin
Da (kDa)	Dalton (Kilodalton)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
G6PDH	Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
GA ₃	Gibberellinsäure A3
<i>gfp</i>	cDNA des GFP
GFP	grünfluoreszierendes Protein
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoic acid
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HSA	humanes Serumalbumin
HV _{ox}	oxidiertes Homovanillat
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
LOX	Lysinoxidase
M+S-Salze	Murashige & Skoog Salze
MES	(2-(N-Morpholin))ethansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
mut ^s	„methanol utilization slow“
mut ⁺	„methanol utilization positive“
NAA	1-Naphtalenessigsäure (Auxin)
NBT	Nitro tetrazolium blue
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
scFv	„single chain“ = Einzelkettenantikörper
SDS	Natriumdodecylsulfat
sLOX	synthetisches Lysinoxidase Gen
Spc	Spectinomycin
sTEL	synthetisches Tropoelastin Gen
Str	Streptomycin
TEL	Tropoelastin
Tet	Tetrazyklin
TEV	„tobacco etch virus“
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminopentan
TSP	„total soluble protein“
U	Unit(s)
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galacto-pyranosid

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	cDNA-Struktur von humanem Tropoelastin.....	9
Abb. 2:	Schematische Darstellung der Methode zur Herstellung synthetischer Gene nach Fuhrmann <i>et al.</i> (1999).....	23
Abb. 3:	Schematischer Vergleich der Lage von Restriktionsschnittstellen auf den Sequenzen der humanen (<i>hLOX</i>) und synthetischen <i>LOX</i> (<i>sLOX</i>).....	43
Abb. 4:	Sequenzvergleich der humanen (<i>hLOX</i>) und synthetischen (<i>sLOX</i>) <i>LOX</i> -Sequenz.....	44
Abb. 5:	Schematische Darstellung der Klonierungsschritte zur Assemblierung des synthetischen <i>LOX</i> -Gens.....	45
Abb. 6:	Expressionskassetten für die Synthese von <i>LOX</i> in <i>Pichia pastoris</i>	46
Abb. 7:	Western-Blot Analyse von zwei KM71H:pMPB 9-19 Klonen.....	47
Abb. 8:	Schematische Darstellung der Expressionskassette in pASK-IBA5-s <i>LOX</i> zur cytosolischen Expression der <i>LOX</i> in <i>E. coli</i>	48
Abb. 9:	Wachstumskurve von zwei unabhängigen induzierten XL1-Blue:pASK-IBA5-s <i>LOX</i> Klonen im Vergleich mit einer nicht-induzierten Kontrolle.....	49
Abb. 10:	Western-Blot Analyse der <i>LOX</i> -Expression in BL21.....	49
Abb. 11:	Western-Blot Analyse induzierter BL21-Zellen nach Auftrennung in lösliche und unlösliche Protein-Fraktion.....	50
Abb. 12:	Reaktionsschema des gekoppelten <i>LOX</i> -Aktivitätstest.....	50
Abb. 13:	Bestimmung der Peroxidase-Aktivität nach Inkubation mit steigenden H ₂ O ₂ -Mengen.....	51
Abb. 14:	Aufbau der T-DNA zur Expression von <i>LOX</i> in Pflanzen.....	52
Abb. 15:	Northern-Blot von Gesamt-RNA aus pMPB 9-27 Pflanzen.....	53
Abb. 16:	Nachweis von rekombinanter <i>LOX</i> im Western-Blot mit unterschiedlichen Antikörpern.....	54
Abb. 17:	Schematische Darstellung der Expressionskassetten zur transienten Expression von GFP und <i>LOX</i> -GFP-Fusionsproteinen in isolierten Protoplasten.....	56
Abb. 18:	Mikroskopische Aufnahmen von BY2-Protoplasten nach Kontroll-Transformation mit pCATgfp bzw. mit pMPB 9-41.....	57
Abb. 19:	Mikroskopische Aufnahmen von transformierten Mesophyll-Protoplasten.....	58
Abb. 20:	Schematischer Vergleich der Lage von Restriktionsschnittstellen auf den Sequenzen der humanen und synthetischen <i>TEL</i> -DNA.....	60
Abb. 21:	Sequenzvergleich der humanen <i>TEL</i> -cDNA (<i>hTEL</i>) mit der synthetischen Sequenz (<i>sTEL</i>).....	62
Abb. 22:	Klonierungsschema der <i>sTEL</i> -Subfragmente und deren Assemblierung zum vollständigen synthetischen Gen.....	64
Abb. 23:	Konstrukte zur Expression von <i>TEL</i> in <i>Pichia pastoris</i>	65
Abb. 24:	Aufbau der Expressionskassetten von pMPB 9-35 (A) und pASK-IBA4-s <i>TEL</i> (B).....	66
Abb. 25:	Western-Blot Analyse nach cytosolischer Expression von <i>TEL</i> in XL1-Blue bei 30°C.....	66
Abb. 26:	Wachstumskurven von induzierten XL1-Blue-Expressionskulturen bei 30°C.....	67
Abb. 27:	Western-Blot Analyse der <i>TEL</i> -Degradationsprodukte nach Expression in Bakterienzellen.....	68
Abb. 28:	Western-Blot Analyse der <i>TEL</i> -Expression bei 30°C und 37°C und Vergleich der löslichen und unlöslichen Fremdprotein-Anteile nach cytosolischer Expression in BL21.....	69
Abb. 29:	Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der Reinigungsfractionen nach Affinitätsreinigung von <i>TEL</i>	70
Abb. 30:	Western-Blot der Reinigungsfractionen nach Entwicklung mit Strep-Tactin-gekoppelter Alkalischer Phosphatase.....	70
Abb. 31:	Western-Blot Analyse zum Test der Stabilität von <i>TEL</i> im BL21-Rohextrakt.....	71
Abb. 32:	Western-Blot Analyse der Abreicherung von rekombinantem <i>TEL</i>	72
Abb. 33:	Western-Blot Analyse der <i>TEL</i> -Degradation nach Zugabe von Proteaseinhibitoren.....	72
Abb. 34:	Western-Blot Analyse zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit der <i>TEL</i> -Degradation in Gefäßen unterschiedlichen Materials.....	73
Abb. 35:	Aufbau der T-DNA-Region der binären Vektoren pMPB 9-32 (A) und pMPB 9-39 (B).....	74
Abb. 36:	Northern-Blot von Gesamt-RNA verschiedener pMPB 9-39-Linien (plastidäres Konstrukt).....	75
Abb. 37:	Test des <i>TEL</i> -Antiserums im Western-Blot.....	76
Abb. 38:	Nachweis von plastidär lokalisiertem <i>TEL</i> aus Blattproben im Western-Blot.....	77
Abb. 39:	Schematische Darstellung der Expressionskassetten zur transienten Expression von <i>TEL</i> und <i>TEL</i> :GFP in Protoplasten.....	78
Abb. 40:	Western-Blots der BY2-Protoplastenextrakte nach transientscher Expression.....	79

8 LITERATUR

- Adang, MJ, Brody, MS, Cardineau, G, Eagan, N, Roush, RT, Shewmaker, CK, Jones, A, Oakes, JV and McBride, KE** (1993). "The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis* cryIIIA gene in protoplasts and potato plants." Plant Mol Biol **21**(6): 1131-1145.
- Artsaenko, O, Kettig, B, Fiedler, U, Conrad, U and Düring, K** (1998). "Potato tubers as a biofactory for recombinant antibodies." Molecular Breeding **4**(4): 313-319.
- Au, LC, Yang, FY, Yang, WJ, Lo, SH and Kao, CF** (1998). "Gene synthesis by a LCR-based approach: high-level production of leptin- L54 using synthetic gene in *Escherichia coli*." Biochem Biophys Res Commun **248**(1): 200-203.
- Baccarani-Contri, M, Vincenzi, D, Cicchetti, F, Mori, G and Pasquali-Ronchetti, I** (1990). "Immunocytochemical localization of proteoglycans within normal elastin fibers." Eur J Cell Biol **53**(2): 305-312.
- Bashir, MM, Indik, Z, Yeh, H, Ornstein-Goldstein, N, Rosenbloom, JC, Abrams, W, Fazio, M, Uitto, J and Rosenbloom, J** (1989). "Characterization of the complete human elastin gene. Delineation of unusual features in the 5'-flanking region." J Biol Chem **264**(15): 8887-8891.
- Bergeron, JJ, Brenner, MB, Thomas, DY and Williams, DB** (1994). "Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum." Trends Biochem Sci **19**(3): 124-128.
- Birnboim, HC and Doly, J** (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-1523.
- Bradford, MM** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Bressan, GM, Daga-Gordini, D, Colombatti, A, Castellani, I, Marigo, V and Volpin, D** (1993). "Emilin, a component of elastic fibers preferentially located at the elastin-microfibrils interface." J Cell Biol **121**(1): 201-212.
- Brown-Augsburger, P, Broekelmann, T, Rosenbloom, J and Mecham, RP** (1996). "Functional domains on elastin and microfibril-associated glycoprotein involved in elastic fibre assembly [published erratum appears in *Biochem J* 1997 May 1;323(Pt 3):863]." Biochem J **318**(Pt 1): 149-155.
- Brown-Augsburger, P, Tisdale, C, Broekelmann, T, Sloan, C and Mecham, RP** (1995). "Identification of an elastin cross-linking domain that joins three peptide chains. Possible role in nucleated assembly." J Biol Chem **270**(30): 17778-17783.
- Bülow, L, Köhler, U, Hehl, R and Düring, K** (1999). "Induction of the Maize GapC4 Promoter in Transgenic Potato under Anaerobiosis and in *Erwinia carotovora*-Inoculated Tuber Tissue." Molecular Plant-Microbe Interactions **3**.
- Bullock, W, Fernandez, J and Short, J** (1987). "XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection." Arch Biochem Biophys **288**: 1-9.
- Burnette, WN** (1981). "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem **112**(2): 195-203.
- Chargelegue, D, Vine, ND, van Dolleweerd, CJ, Drake, PM and Ma, JK** (2000). "A murine monoclonal antibody produced in transgenic plants with plant- specific glycans is not immunogenic in mice." Transgenic Res **9**(3): 187-194.
- Chong, DK and Langridge, WH** (2000). "Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants." Transgenic Res **9**(1): 71-78.

- Chong, DK, Roberts, W, Arakawa, T, Illes, K, Bagi, G, Slattery, CW and Langridge, WH** (1997). "Expression of the human milk protein beta-casein in transgenic potato plants." Transgenic Res **6**(4): 289-296.
- Clare, JJ, Rayment, FB, Ballantine, SP, Sreekrishna, K and Romanos, MA** (1991). "High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene." Biotechnology (N Y) **9**(5): 455-460.
- Conrad, U and Fiedler, U** (1998). "Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity." Plant Mol Biol **38**(1-2): 101-109.
- Cregg, JM, Vedvick, TS and Raschke, WC** (1993). "Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*." Biotechnology (N Y) **11**(8): 905-910.
- Curran, ME, Atkinson, DL, Ewart, AK, Morris, CA, Leppert, MF and Keating, MT** (1993). "The elastin gene is disrupted by a translocation associated with supravalvular aortic stenosis." Cell **73**(1): 159-168.
- Dai, ZY, Hooker, BS, Anderson, DB and Thomas, SR** (2000a). "Improved plant-based production of E1 endoglucanase using potato: expression optimization and tissue targeting." Mol Breeding **6**(3): 277-285.
- Dai, Z, Hooker, BS, Anderson, DB and Thomas, SR** (2000b). "Expression of *Acidothermus cellulolyticus* endoglucanase E1 in transgenic tobacco: biochemical characteristics and physiological effects." Transgenic Res **9**(1): 43-54.
- Daniell, H, Streatfield, SJ and Wycoff, K** (2001). "Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants." Trends Plant Sci **6**(5): 219-226.
- de Cosa, B, Moar, W, Lee, SB, Miller, M and Daniell, H** (2001). "Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals." Nat Biotechnol **19**(1): 71-74.
- Debelle, L and Tamburro, AM** (1999). "Elastin: molecular description and function." Int J Biochem Cell Biol **31**(2): 261-272.
- di Sansebastiano, GP, Paris, N, Marc-Martin, S and Neuhaus, JM** (1998). "Specific accumulation of GFP in a non-acidic vacuolar compartment via a C-terminal propeptide-mediated sorting pathway." Plant J **15**(4): 449-457.
- Düring, K** (1988). "Wundinduzierbare Expression und Sekretion von T4-Lysozym [T-Lysozym] und monoklonalen Antikörpern in *Nicotiana tabacum*." Dissertation, Universität Köln.
- Düring, K, Hippe, S, Kreuzaler, F and Schell, J** (1990). "Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic *Nicotiana tabacum*." Plant Mol Biol **15**(2): 281-293.
- Elbein, AD** (1991). "The role of N-linked oligosaccharides in glycoprotein function." Trends Biotechnol **9**(10): 346-352.
- Ellerström, M, Stalberg, K, Ezcurra, I and Rask, L** (1996). "Functional dissection of a napin gene promoter: identification of promoter elements required for embryo and endosperm-specific transcription." Plant Mol Biol **32**(6): 1019-1027.
- Ellgaard, L and Helenius, A** (2001). "ER quality control: towards an understanding at the molecular level." Curr Opin Cell Biol **13**(4): 431-437.
- Ellgaard, L, Molinari, M and Helenius, A** (1999). "Setting the standards: quality control in the secretory pathway." Science **286**(5446): 1882-1888.
- Elmayan, T and Vaucheret, H** (1996). "Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally." Plant J **9**(6): 787-797.

- English, JJ, Müller, E and Baulcombe, DC** (1996). "Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes." Plant Cell **8**(2): 179-188.
- Evan, GI, Lewis, GK, Ramsay, G and Bishop, JM** (1985). "Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto- oncogene product." Mol Cell Biol **5**(12): 3610-3616.
- Fazio, MJ, Mattei, MG, Passage, E, Chu, ML, Black, D, Solomon, E, Davidson, JM and Uitto, J** (1991). "Human elastin gene: new evidence for localization to the long arm of chromosome 7." Am J Hum Genet **48**(4): 696-703.
- Fazio, MJ, Olsen, DR, Kauh, EA, Baldwin, CT, Indik, Z, Ornstein-Goldstein, N, Yeh, H, Rosenbloom, J and Uitto, J** (1988). "Cloning of full-length elastin cDNAs from a human skin fibroblast recombinant cDNA library: further elucidation of alternative splicing utilizing exon-specific oligonucleotides." J Invest Dermatol **91**(5): 458-464.
- Fiedler, U, Phillips, J, Artsaenko, O and Conrad, U** (1997). "Optimization of scFv antibody production in transgenic plants." Immunotechnology **3**(3): 205-216.
- Fornieri, C, Baccarani-Contri, M, Quagliano, D, Jr. and Pasquali-Ronchetti, I** (1987). "Lysyl oxidase activity and elastin/glycosaminoglycan interactions in growing chick and rat aortas." J Cell Biol **105**(3): 1463-1469.
- Fuhrmann, M, Oertel, W and Hegemann, P** (1999). "A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*." Plant J **19**(3): 353-361.
- Garcia-Casado, G, Sanchez-Monge, R, Chrispeels, MJ, Armentia, A, Salcedo, G and Gomez, L** (1996). "Role of complex asparagine-linked glycans in the allergenicity of plant glycoproteins." Glycobiology **6**(4): 471-477.
- Gebelein, CG**, Ed. (1993). *Biotechnological Polymers: Medical, Pharmaceutical and Industrial Applications - A Conference in Print*. Edgewater, Florida, Technomic Publishing Co., Inc.
- Gibson, MA, Hatzinikolas, G, Kumaratilake, JS, Sandberg, LB, Nicholl, JK, Sutherland, GR and Cleary, EG** (1996). "Further characterization of proteins associated with elastic fiber microfibrils including the molecular cloning of MAGP-2 (MP25) [published erratum appears in J Biol Chem 1996 Mar 1;271(9):5288]." J Biol Chem **271**(2): 1096-1103.
- Gibson, MA, Kumaratilake, JS and Cleary, EG** (1989). "The protein components of the 12-nanometer microfibrils of elastic and nonelastic tissues." J Biol Chem **264**(8): 4590-4598.
- Gibson, MA, Sandberg, LB, Grosso, LE and Cleary, EG** (1991). "Complementary DNA cloning establishes microfibril-associated glycoprotein (MAGP) to be a discrete component of the elastin-associated microfibrils." J Biol Chem **266**(12): 7596-7601.
- Goddijn, OJM and Pen, J** (1995). "Plants as bioreactors." TIBTECH **13**: 379-387.
- Gomord, V, Wee, E and Faye, L** (1999). "Protein retention and localization in the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus." Biochimie **81**(6): 607-618.
- Grebenok, RJ, Pierson, E, Lambert, GM, Gong, FC, Afonso, CL, Haldeman-Cahill, R, Carrington, JC and Galbraith, DW** (1997). "Green-fluorescent protein fusions for efficient characterization of nuclear targeting." Plant J **11**(3): 573-586.
- Guda, C, Lee, SB and Daniell, H** (2000). "Stable expression of a biodegradable protein-based polymer in tobacco chloroplasts." Plant Cell Reports **19**: 257-262.
- Hall, TA** (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." Nucl Acids Symp Ser **41**: 95-98.
- Hanahan, D** (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-580.

- Hart, RA, Rinas, U and Bailey, JE** (1990). "Protein composition of Vitreoscilla hemoglobin inclusion bodies produced in Escherichia coli." J Biol Chem **265**(21): 12728-12733.
- Hausmann, L and Töpfer, R** (1999). "Entwicklung von Plasmid-Vektoren." Vorträge zur Pflanzenzüchtung: Bioengineering für Rapsorten nach Maß **45**: 155-172.
- Heim, RA, Pierce, RA, Deak, SB, Riley, DJ, Boyd, CD and Stolle, CA** (1991). "Alternative splicing of rat tropoelastin mRNA is tissue-specific and developmentally regulated." Matrix **11**(5): 359-366.
- Hensgens, LA, Fornerod, MW, Rueb, S, Winkler, AA, van der Veen, S and Schilperoort, RA** (1992). "Translation controls the expression level of a chimaeric reporter gene." Plant Mol Biol **20**(5): 921-938.
- Hiatt, A, Cafferkey, R and Bowdish, K** (1989). "Production of antibodies in transgenic plants." Nature **342**(6245): 76-78.
- Hill, K and Cooper, AA** (2000). "Degradation of unassembled Vph1p reveals novel aspects of the yeast ER quality control system." Embo J **19**(4): 550-561.
- Hinek, A** (1997). "Elastin receptor and cell-matrix interactions in heart transplant- associated arteriosclerosis." Arch Immunol Ther Exp **45**(1): 15-29.
- Hinek, A, Mecham, RP, Keeley, F and Rabinovitch, M** (1991). "Impaired elastin fiber assembly related to reduced 67-kD elastin- binding protein in fetal lamb ductus arteriosus and in cultured aortic smooth muscle cells treated with chondroitin sulfate." J Clin Invest **88**(6): 2083-2094.
- Hinek, A and Rabinovitch, M** (1994). "67-kD elastin-binding protein is a protective "companion" of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin." J Cell Biol **126**(2): 563-574.
- Höfgen, R and Willmitzer, L** (1988). "Storage of competent cells for Agrobacterium transformation." Nucleic Acids Res **16**(20): 9877.
- Hood, EE, S.B., G, Melchers, LS and Hoekema, A** (1993). "New Agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants." Transgen. Res. **2**: 208-218.
- Huang, L, Franklin, AE and Hoffman, NE** (1993). "Primary structure and characterization of an Arabidopsis thaliana calnexin-like protein." J Biol Chem **268**(9): 6560-6566.
- Indik, Z, Abrams, WR, Kucich, U, Gibson, CW, Mecham, RP and Rosenbloom, J** (1990). "Production of recombinant human tropoelastin: characterization and demonstration of immunologic and chemotactic activity." Arch Biochem Biophys **280**(1): 80-86.
- Indik, Z, Yeh, H, Ornstein-Goldstein, N, Sheppard, P, Anderson, N, Rosenbloom, JC, Peltonen, L and Rosenbloom, J** (1987). "Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(16): 5680-5684.
- Joshi, CP** (1987). "Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants: a compilation and analysis." Nucleic Acids Res **15**(23): 9627-9640.
- Kagan, HM, Vaccaro, CA, Bronson, RE, Tang, SS and Brody, JS** (1986). "Ultrastructural immunolocalization of lysyl oxidase in vascular connective tissue." J Cell Biol **103**(3): 1121-1128.
- Kagan, HM, Williams, MA, Williamson, PR and Anderson, JM** (1984). "Influence of sequence and charge on the specificity of lysyl oxidase toward protein and synthetic peptide substrates." J Biol Chem **259**(18): 11203-11207.
- Karlsson, C and Pines, J** (1998). Green Fluorescent Protein. Cell Biology: A Laboratory Handbook. **4**.
- Kay, R, Chan, A, Daly, M and McPherson, J** (1987). "Duplication of CaMV 35S Promoter Sequences Creates a Strong Enhancer for Plant Genes." Science **236**: 1299-1302.

- Kemppainen, R, Hamalainen, ER, Kuivaniemi, H, Tromp, G, Pihlajaniemi, T and Kivirikko, KI** (1996). "Expression of mRNAs for lysyl oxidase and type III procollagen in cultured fibroblasts from patients with the Menkes and occipital horn syndromes as determined by quantitative polymerase chain reaction." Arch Biochem Biophys **328**(1): 101-106.
- Kessler, MM, Beckendorf, RC, Westhafer, MA and Nordstrom, JL** (1986). "Requirement of A-A-U-A-A-A and adjacent downstream sequences for SV40 early polyadenylation." Nucleic Acids Res **14**(12): 4939-4952.
- Klöggen, RB, Saedler, H and Weil, JH** (1989). "The amyloplast-targeting transit peptide of the waxy protein of maize also mediates protein transport in vitro into chloroplasts." Mol Gen Genet **217**(1): 155-161.
- Kusnadi, AR** (1997). "Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations." Biotechnol bioeng **56**(5): 473-484.
- Laemmli, UK** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-685.
- Lassen, SF, Mortensen, KK and Sperling-Petersen, HU** (1992). "OmpT proteolysis of E. coli initiation factor IF2. Elimination of a cleavage site by site-directed mutagenesis." Biochem Int **27**(4): 601-611.
- Leite, A, Kemper, EL, da Silva, MJ, Luchessi, AD, Siloto, RMP, Bonaccorsi, ED, El-Dorry, HF and Arruda, P** (2000). "Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants." Molecular Breeding **6**: 47-53.
- Lou, H, McCullough, AJ and Schuler, MA** (1993). "3' splice site selection in dicot plant nuclei is position dependent." Mol Cell Biol **13**(8): 4485-4493.
- Makrides, SC** (1996). "Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli." Microbiol Rev **60**(3): 512-538.
- Mariani, TJ, Trackman, PC, Kagan, HM, Eddy, RL, Shows, TB, Boyd, CD and Deak, SB** (1992). "The complete derived amino acid sequence of human lysyl oxidase and assignment of the gene to chromosome 5 (extensive sequence homology with the murine ras resection gene)." Matrix **12**(3): 242-248.
- Martin, SL, Vrhovski, B and Weiss, AS** (1995). "Total synthesis and expression in Escherichia coli of a gene encoding human tropoelastin." Gene **154**(2): 159-166.
- Mason, HS and Arntzen, CJ** (1995). "Transgenic plants as vaccine production systems." Trends Biotechnol **13**(9): 388-392.
- Mason, HS, Lam, DM and Arntzen, CJ** (1992). "Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(24): 11745-11749.
- Mecham, R, Foster, JA and Franzblau, C** (1977). "Proteolysis of tropoelastin." Adv Exp Med Biol **79**: 209-220.
- Mecham, RP** (1991). "Elastin synthesis and fiber assembly." Ann N Y Acad Sci **624**: 137-146.
- Michalak, M, Mariani, P and Opas, M** (1998). "Calreticulin, a multifunctional Ca²⁺ binding chaperone of the endoplasmic reticulum." Biochem Cell Biol **76**(5): 779-785.
- Muench, DG, Wu, Y, Zhang, Y, Li, X, Boston, RS and Okita, TW** (1997). "Molecular cloning, expression and subcellular localization of a BiP homolog from rice endosperm tissue." Plant Cell Physiol **38**(4): 404-412.
- Müntz, K** (1998). "Deposition of storage proteins." Plant Mol Biol **38**(1-2): 77-99.

- Murashige, T and Skoog, F** (1962). "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures." Plant Physiol **15**: 473-497.
- Murray, EE, Lotzer, J and Eberle, M** (1989). "Codon usage in plant genes." Nucleic Acids Res **17**(2): 477-498.
- Neuhaus, JM** (1996). "Protein targeting to the plant vacuole." Plant Physiol Biochem **34**(2): 217-221.
- Nicholas, KB, Nicholas, HB and Deerfield, DW** (1997). GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. Distributed by the author.
- Odell, JT, Nagy, F and Chua, NH** (1985). "Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter." Nature **313**(6005): 810-812.
- Ohme-Takagi, M, Taylor, CB, Newman, TC and Green, PJ** (1993). "The effect of sequences with high AU content on mRNA stability in tobacco." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(24): 11811-11815.
- Osteryoung, KW, Toenjes, K, Hall, B, Winkler, V and Bennett, AB** (1990). "Analysis of tomato polygalacturonase expression in transgenic tobacco." Plant Cell **2**(12): 1239-1248.
- Ouzzine, M, Boyd, A and Hulmes, DJ** (1996). "Expression of active, human lysyl oxidase in Escherichia coli." FEBS Lett **399**(3): 215-219.
- Page, A and Angell, S** (2001). Transient Expression of Some Reporter Proteins Can Alter Plant Gene Expression. 10th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, University of Wisconsin, Madison.
- Parks, WC, Secrist, H, Wu, LC and Mecham, RP** (1988). "Developmental regulation of tropoelastin isoforms." J Biol Chem **263**(9): 4416-4423.
- Parodi, AJ** (1999). "Reglucosylation of glycoproteins and quality control of glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum of yeast cells." Biochim Biophys Acta **1426**(2): 287-295.
- Pasquali-Ronchetti, I and Baccarani-Contri, M** (1997). "Elastic fiber during development and aging." Microsc Res Tech **38**(4): 428-435.
- Pedrazzini, E, Giovinazzo, G, Bielli, A, de Virgilio, M, Frigerio, L, Pesca, M, Faoro, F, Bollini, R, Ceriotti, A and Vitale, A** (1997). "Protein quality control along the route to the plant vacuole." Plant Cell **9**(10): 1869-1880.
- Perlak, FJ, Fuchs, RL, Dean, DA, McPherson, SL and Fischhoff, DA** (1991). "Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(8): 3324-3328.
- Petsch, D and Anspach, FB** (2000). "Endotoxin removal from protein solutions." J Biotechnol **76**(2-3): 97-119.
- Phillips, TA, van Bogelen, RA and Neidhardt, FC** (1984). "lon gene product of Escherichia coli is a heat-shock protein." J Bacteriol **159**(1): 283-287.
- Reiser, K, McCormick, RJ and Rucker, RB** (1992). "Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin." Faseb J **6**(7): 2439-2449.
- Richter, LJ, Thanavala, Y, Arntzen, CJ and Mason, HS** (2000). "Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization [In Process Citation]." Nat Biotechnol **18**(11): 1167-1171.
- Roark, EF, Keene, DR, Haudenschild, CC, Godyna, S, Little, CD and Argraves, WS** (1995). "The association of human fibulin-1 with elastic fibers: an immunohistological, ultrastructural, and RNA study." J Histochem Cytochem **43**(4): 401-411.

- Rogers, JC and Milliman, C** (1983). "Isolation and sequence analysis of a barley alpha-amylase cDNA clone." J Biol Chem **258**(13): 8169-8174.
- Rosenfeld, SA** (1999). "Use of *Pichia pastoris* for expression of recombinant proteins." Methods Enzymol **306**: 154-169.
- Ruggiero, F, Exposito, JY, Bournat, P, Gruber, V, Perret, S, Comte, J, Olganier, B, Garrone, R and Theisen, M** (2000). "Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants." FEBS Lett **469**(1): 132-136.
- Sage, H and Gray, WR** (1979). "Studies on the evolution of elastin--I. Phylogenetic distribution." Comp Biochem Physiol [B] **64**(4): 313-327.
- Sakai, LY, Keene, DR and Engvall, E** (1986). "Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils." J Cell Biol **103**(6 Pt 1): 2499-2509.
- Salmon, V, Legrand, D, Slomianny, MC, el Yazidi, I, Spik, G, Gruber, V, Bournat, P, Olganier, B, Mison, D, Theisen, M and Merot, B** (1998). "Production of human lactoferrin in transgenic tobacco plants." Protein Expr Purif **13**(1): 127-135.
- Sambrook, J, Fritsch, E and Maniatis, T** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scheller, J, Guhrs, KH, Grosse, F and Conrad, U** (2001). "Production of spider silk proteins in tobacco and potato." Nat Biotechnol **19**(6): 573-577.
- Schillberg, S, Zimmermann, S, Voss, A and Fischer, R** (1999). "Apoplastic and cytosolic expression of full-size antibodies and antibody fragments in *Nicotiana tabacum*." Transgenic Res **8**(4): 255-263.
- Shaw, G and Kamen, R** (1986). "A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation." Cell **46**(5): 659-667.
- Sijmons, PC, Dekker, BM, Schrammeijer, B, Verwoerd, TC, van den Elzen, PJ and Hoekema, A** (1990). "Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants." Biotechnology (N Y) **8**(3): 217-221.
- Sjödahl, S, Gustavsson, HO, Rödin, J and Rask, L** (1995). "Deletion analysis of the *Brassica napus* cruciferin gene cru 1 promoter in transformed tobacco: promoter activity during early and late stages of embryogenesis is influenced by cis-acting elements in partially separate regions." Planta **197**(2): 264-271.
- Smith, GP** (1978). "Sequence of the full-length immunoglobulin kappa-chain of mouse myeloma MPC 11." Biochem J **171**(2): 337-347.
- Smith-Mungo, LI and Kagan, HM** (1998). "Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology." Matrix Biol **16**(7): 387-398.
- Smoot, LB** (1995). "Elastin gene deletions in Williams syndrome." Curr Opin Pediatr **7**(6): 698-701.
- Staub, JM, Garcia, B, Graves, J, Hajdukiewicz, PT, Hunter, P, Nehra, N, Paradkar, V, Schlittler, M, Carroll, JA, Spatola, L, Ward, D, Ye, G and Russell, DA** (2000). "High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts." Nat Biotechnol **18**(3): 333-338.
- Sugita, M, Manzara, T, Pichersky, E, Cashmore, A and Gruissem, W** (1987). "Genomic organization, sequence analysis and expression of all five genes encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from tomato." Mol Gen Genet **209**(2): 247-256.
- Takase, K and Hagiwara, K** (1998). "Expression of human alpha-lactalbumin in transgenic tobacco." J Biochem (Tokyo) **123**(3): 440-444.

- Thompson, JD, Higgins, DG and Gibson, TJ** (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res **22**(22): 4673-4680.
- Töpfer, R, Matzeit, V, Gronenborn, B, Schell, J and Steinbiss, HH** (1987). "A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions." Nucleic Acids Res **15**(14): 5890.
- Trackman, PC and Kagan, HM** (1979). "Nonpeptidyl amine inhibitors are substrates of lysyl oxidase." J Biol Chem **254**(16): 7831-7836.
- Trackman, PC, Zoski, CG and Kagan, HM** (1981). "Development of a peroxidase-coupled fluorometric assay for lysyl oxidase." Anal Biochem **113**(2): 336-342.
- Trackman, PC, Bedell-Hogan, D, Tang, J and Kagan, HM** (1992). "Post-translational glycosylation and proteolytic processing of a lysyl oxidase precursor." J Biol Chem **267**(12): 8666-8671.
- Urry, DW, Nicol, A, Gowda, DC, Hoban, LD, McKee, A, Williams, T, Olsen, DB and Cox, BA** (1993). Medical Applications Of Bioelastic Materials. Biotechnological Polymers, Technomic Publication.
- Uzel, MI, Scott, IC, Babakhanlou-Chase, H, Palamakumbura, AH, Pappano, WN, Hong, HH, Greenspan, DS and Trackman, PC** (2001). "Multiple Bone Morphogenetic Protein 1-related Mammalian Metalloproteinases Process Pro-lysyl Oxidase at the Correct Physiological Site and Control Lysyl Oxidase Activation in Mouse Embryo Fibroblast Cultures." J Biol Chem **276**(25): 22537-22543.
- van Ree, R, Cabanes-Macheteau, M, Akkerdaas, J, Milazzo, JP, Loutelier-Bourhis, C, Rayon, C, Villalba, M, Koppelman, S, Aalberse, R, Rodriguez, R, Faye, L and Lerouge, P** (2000). "Beta(1,2)-xylose and alpha(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens." J Biol Chem **275**(15): 11451-11458.
- Vankan, P, Edoh, D and Filipowicz, W** (1988). "Structure and expression of the U5 snRNA gene of Arabidopsis thaliana. Conserved upstream sequence elements in plant U-RNA genes." Nucleic Acids Res **16**(22): 10425-10440.
- Velten, J, Velten, L, Hain, R and Schell, J** (1984). "Isolation of a dual plant promoter fragment from the Ti plasmid of Agrobacterium tumefaciens." EMBO J **3**(12): 2723-2730.
- Vervliet, G, Holsters, M, Teuchy, H, van Montagu, M and Schell, J** (1975). "Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in Agrobacterium." J Gen Virol **26**(1): 33-48.
- Voelker, TA, Herman, EM and Chrispeels, MJ** (1989). "In vitro mutated phytohemagglutinin genes expressed in tobacco seeds: role of glycans in protein targeting and stability." Plant Cell **1**(1): 95-104.
- von Arnim, AG, Deng, XW and Stacey, MG** (1998). "Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants." Gene **221**(1): 35-43.
- Vrhovski, B, Jensen, S and Weiss, AS** (1997). "Coacervation characteristics of recombinant human tropoelastin." Eur J Biochem **250**(1): 92-98.
- Vrhovski, B and Weiss, AS** (1998). "Biochemistry of tropoelastin." Eur J Biochem **258**(1): 1-18.
- Wenderoth, I, Scheibe, R and von Schaewen, A** (1997). "Identification of the cysteine residues involved in redox modification of plant plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase." J Biol Chem **272**(43): 26985-26990.
- Wendt, UK** (1998). "Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zu pflanzlichen Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Isoformen." Diplomarbeit, Universität Osnabrück.

- Wendt, UK, Wenderoth, I, Tegeler, A and von Schaewen, A** (2000). "Molecular characterization of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.)." Plant J **23**(6): 723-733.
- Whitelam, GC** (1995). "The Production of Recombinant Proteins in Plants." J Sci Food Agric **68**: 1-9.
- Wilkinson, DL and Harrison, RG** (1991). "Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*." Biotechnology (N Y) **9**(5): 443-448.
- Zawodny, S and Martini, N** (2000). "Isolation and analysis of a cDNA clone encoding the small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase in the plastids of seeds and leaves of Oilseed rape (*Brassica napus*)." access number AJ271162.
- Zhang, H, Apfelroth, SD, Hu, W, Davis, EC, Sanguinetti, C, Bonadio, J, Mecham, RP and Ramirez, F** (1994). "Structure and expression of fibrillin-2, a novel microfibrillar component preferentially located in elastic matrices." J Cell Biol **124**(5): 855-863.
- Zhang, MC, Giro, M, Quaglino, D, Jr. and Davidson, JM** (1995). "Transforming growth factor-beta reverses a posttranscriptional defect in elastin synthesis in a cutis laxa skin fibroblast strain." J Clin Invest **95**(3): 986-994.
- Zhang, X, Urry, DW and Daniell, H** (1996). "Expression of an environmentally friendly synthetic protein-based polymer gene in transgenic tobacco plants." Plant Cell Rep **16**(3/4): 174-179.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Urte Kristina Wendt

geboren am 25.11.1971 in Berlin
ledig

Hochschulausbildung

seit 01/1999	Promotion an der TU Braunschweig unter Anleitung von Herrn PD Dr. Düring. Durchführung der praktischen Arbeiten bei der Firma MPB Cologne GmbH, Köln zum Thema: „Expression von Tropoelastin und Lysinoxidase in Pflanzen“
08/1998 – 12/1998	Wissenschaftliche Angestellte an der Universität Osnabrück in der Arbeitsgruppe Pflanzenphysiologie bei Frau Dr. von Schaewen
07/1997 – 07/1998	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Pflanzenphysiologie von Prof. Dr. Scheibe unter Anleitung von Frau Dr. von Schaewen zum Thema: „Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zu pflanzlichen Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Isoformen“
04/1996 – 05/1996	Sechs-Wochen-Praktikum am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Müller-Röber
10/1992 – 07/1998	Studium Diplom-Biologie an der Universität Osnabrück. Schwerpunkte: Biochemie, Pflanzenphysiologie und Genetik

Schulausbildung

1984 – 1992	Gymnasium Himmelsthür, Hildesheim Allgemeine Hochschulreife
1982 – 1984	Gymnasium Andreanum, Hildesheim
1978 – 1982	Grundschule Borsum, Landkreis Hildesheim

Danksagung

Am Ende dieser Arbeit liegt es mir noch am Herzen, einigen Menschen besonders zu danken, deren Unterstützung und Anregungen diese Arbeit in entscheidender Weise beeinflusst haben.

Hier möchte ich zuerst Dr. Irina Wenderoth erwähnen, die mir während der gesamten Zeit mit ihrem Ideenreichtum zur Seite stand und mir dadurch aus vielen Frustrationstälern geholfen hat. Außerdem hat sie mit großem Elan dieses Werk korrigiert und die schlimmsten Formulierungen eliminieren können.

Ganz besonders danken möchte ich zudem Dr. Renate Lührs. Sie hat mich häufig von ihrem Erfahrungsschatz profitieren lassen und mit zahlreichen Ideen den Diskussionsteil dieser Arbeit positiv beeinflusst.

Dr. Klaus Düring möchte ich für die Überlassung des Themas und das entgegengebrachte Vertrauen danken.

Dem Team von Labor 39/5 danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die technische Unterstützung. Niels Hanisch hat mir bei den Pflanzenanalysen geholfen und durch seine endlose Geduld überhaupt ermöglicht, daß in so kurzer Zeit so viele Daten zusammengetragen werden konnten. Susanne Haupt hat die BY2-Zellen gepflegt und so immer für gute Ergebnisse bei den transienten Tests gesorgt. Meiner Praktikantin Anja Roder danke ich für die Ausdauer und das Engagement, das sie bei der Anzucht der Hefe-Zellen aufgebracht hat. Schließlich hat uns dieser Organismus doch um so manches Wochenende gebracht.

Olaf Brinkmann, Steffi Biernacki und Dr. Dagmar Petsch haben mir in den letzten Jahren durch außerbetriebliche Aktivitäten oft den Alltag versüßt und mich mit genialen Mahlzeiten in eine optimale und produktive körperliche Verfassung versetzt. Danke! Steffi Biernacki gebührt außerdem noch großer Dank, da sie als einziges MPB-Mitglied bereitwillig jede Woche die Fußballergebnisse mit mir diskutiert hat.

Zuletzt möchte ich mich bei dem ganzen MPB-Team für die letzten drei Jahren bedanken. Ich habe immer gerne mit Euch zusammengearbeitet!